



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



PAPEL DE LAS PROTEÍNAS HP1 EN SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA

TESIS DOCTORAL

ÁNGEL SERRANO SÁNCHEZ

Madrid, 2010

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
SUMMARY.....	11
INTRODUCCIÓN	13
1. Cohesión regulada por Cohesina	15
1.1 Arquitectura de la Cohesina.....	15
1.2 Modelo de funcionamiento de la Cohesina	18
1.3 Regulación de la Cohesina en el ciclo celular	18
1.3.1 Carga de la Cohesina	19
1.3.2 Distribución genómica de la Cohesina	20
1.3.3 Establecimiento de la cohesión en fase S	21
1.3.4 Disociación de la Cohesina en mitosis.....	22
1.4 Cohesión mediada por catenaciones	23
2. Papel de la heterocromatina en la regulación de la cohesión	24
2.1 ¿Qué es la heterocromatina?.....	24
2.2 La heterocromatina pericentromérica	25
2.3 La proteína HP1.....	27
2.4 Cohesina y heterocromatina pericentromérica	30
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Cultivo de células y tratamientos con drogas	36
Western blot.....	37
Inmunofluorescencia	37
Citometría	38
siRNA.....	38
Preparación de extractos de células HeLa	39
Inmunoprecipitación y pull-down	40
Fraccionamiento de cromatina	41
Ensamblaje de cromosomas de <i>Xenopus laevis</i>	42
Preparación de extractos mitóticos a partir de huevos de <i>Xenopus laevis</i>	42
Ensayo quinasas	43
Ensayo fosfatasa	43
Tratamiento con bisulfito sódico.....	43
Clonaje y vectores usados en este estudio	44
Purificación de proteínas recombinantes unidas a GST	44

Anticuerpos primarios	45
RESULTADOS	49
1. Estudio de la función de HP1 en la regulación de la Cohesina	50
1.1 Localización de las proteínas HP1 en células HeLa a lo largo del ciclo celular	50
1.1.1 Estudio de la localización de las proteínas HP1 mediante inmunofluorescencia...	50
1.1.2 Estudio de la localización de las proteínas HP1 mediante fraccionamiento bioquímico	52
1.2 HP1 no interacciona con Cohesina pero en cambio si lo hace con Sgo1	54
1.3 Reducción de los niveles de HP1 mediante ARNi.....	56
1.3.1. El tratamiento con siRNA reduce significativamente los niveles de HP1 en la célula	56
1.3.2 El tratamiento con siRNA elimina la fracción de HP1 presente en los centrómeros	59
1.3.3 La reducción de los niveles de cada proteína HP1 por separado no altera la progresión del ciclo celular	59
1.3.4 La eliminación de HP1 no afecta a la carga de Cohesina en cromatina	61
1.3.5 La eliminación de HP1 α no afecta a la unión de Sgo1 al centrómero.....	62
1.3.6 La eliminación de HP1 γ provoca defectos en mitosis	64
1.3.7 La eliminación de HP1 γ no afecta a la acumulación del CPC en la heterocromatina pericentromérica en interfase	67
2. Efecto de los tratamientos farmacológicos con drogas epigenéticas sobre la regulación de la Cohesina	68
2.1 El tratamiento con TSA y AZA afecta a la organización de la heterocromatina y a la localización de HP1	68
2.2 Los tratamientos con AZA y TSA no afectan a la carga de Cohesina	71
3. Papel de la fosforilación de HP1γ durante mitosis	72
3.1 Fosforilación de HP1 γ en la serina 93 durante mitosis	72
3.2 Localización de HP1 γ -S93P	74
3.3 La fosforilación de HP1 γ en la serina 93 depende de Aurora B in vivo	77
3.4 Aurora B fosforila HP1 γ en la serina 93 in vitro.....	79
3.5 La fosforilación de HP1 γ en la serina 93 aumenta su afinidad por Mis12.....	79
3.6 HP1 α y HP1 β también son fosforiladas por Aurora B e interaccionan con Mis12.....	81
DISCUSIÓN	83
HP1 y la regulación de la cohesión y Cohesina: Discrepancias de resultados.....	84
HP1γ conduce a defectos en mitosis	89
Tratamientos farmacológicos con drogas que alteran el estado de la cromatina	91
La fosforilación de HP1γ durante mitosis	92
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA.....	99
ANEXO.....	113

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido.

ADN: Ácido Desoxiribonucleico.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNi : ARN interferente.

APC: *Anaphase Promoting Complex.*

AZA: 5-aza-2'deoxicitidina.

BSA: *Bovine Serum Albumine.*

CENP-A: *Centromere protein A.*

CPC: *Chromosome Passenger Complex.*

DAPI: *4,6-Diamidino-2-Phenylindole.*

DNMT: *DNA-Methyl-Transferase.*

H3K9Me: Histona H3 metilada en la lisina 9.

H3S10P: Histona H3 fosforilada en la serina 10.

H4K8Ac: Histona H4 acetilada en la lisina 8.

HDAC: *Histone deacetylase.*

HP1: *Heterochromatin protein 1.*

HP1 γ -S93P: HP1 γ fosforilada en la serina 93.

INCENP: *Inner Centromere Protein.*

Kb: Kilobase.

KDa: Kilo Dalton.

KO: Knock-out.

MBP: *Methyl Binding Protein.*

MEF: *Mouse Embryonic Fibroblast.*

PBS: *Phosphatase Buffer Saline.*

PCR: *Poymerase Chain Reaction.*

PDS5: *Precocious Dissociation of Sister chromatids 5.*

PFA: Paraformaldehído.

PSSC: *Premature Separation of Sister Chromatid.*

RNAi: *RNA interference.*

RITS: *RNA-Induced Transcriptional Silencing Complex.*

S93: Serina 93.

S93A: Serina 93 mutada a alanina.

SA: *Stromal Antigen.*

Scc: *Sister Chromatid Cohesión.*

Sgo: Shugoshin (espíritu guardián en japonés).

siRNA: *Small Interference Ribonucleic Acid.*

SMC: *Structural Maintenance Chromosome.*

Suv39: *Supression of variegation 39.*

TBS: *Tris Buffered Saline.*

Topo II: Topoisomerasa II

TSA: Tricostatina A.

WAPL: *Wings apart like.*

ZM: Inhibidor de Aurora B ZM 447439

SUMMARY

SUMMARY

Heterochromatin protein 1 (HP1) is nonhistone chromosomal protein first discovered in *Drosophila melanogaster* because its association with heterochromatin, being one of its major components. Numerous studies have shown that this protein plays a role in heterochromatin formation, gene silencing and activation, nuclear envelope formation, telomere regulation and centromere stability. In this work we have focused on its role in mitosis, especially in regulation of sister chromatid cohesion and kinetochore formation.

Sister chromatid cohesion is mediated by a multiprotein complex known as Cohesin and it is essential for accurate chromosome segregation. Classical studies suggest that heterochromatin promotes cohesion, but whether this happens through regulation of Cohesin remains to be determined. In fission yeast, the HP1 homologue Swi6 interacts with Cohesin and is required for proper targeting and/or stabilization of Cohesin at the centromeric region. To test whether this pathway is conserved in human cells, we have examined the behavior of Cohesin in cells in which the levels of HP1 α , β or γ (the three HP1 proteins present in mammalian organisms) have been reduced by siRNA. We have also studied the consequences of treating human cells with drugs that change the histone modification profile of heterochromatin and thereby affect HP1 localization. Our results show no evidence for a requirement of HP1 proteins for either loading of bulk Cohesin onto chromatin in interphase or retention of Cohesin at pericentric heterochromatin in mitosis. However we have found that depletion of HP1 γ leads to defects in mitotic progression.

We have also observed that HP1 γ is phosphorylated in mitosis in serine 93 in a Aurora B dependent manner. This phosphorylation increases the affinity of HP1 γ for Mis12, a kinetochore protein. We propose that HP1 γ phosphorylation is necessary for the stabilization or maintenance of Mis12 in the kinetochore and in this way contribute to proper chromosome segregation.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La vida depende de la habilidad que tienen las células para almacenar, salvaguardar y traducir la información contenida en las moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) que constituyen su material genético. Además, este material genético debe transmitirse de generación en generación de forma fidedigna. Para ello, los cromosomas se duplican durante la fase S (de síntesis) que precede a la división celular. Las dos moléculas de ADN de un cromosoma resultantes de esta duplicación se denominan cromátidas hermanas, y han de permanecer unidas para asegurar su correcta repartición a las dos células hijas. La unión física de las cromátidas hermanas, o cohesión, se mantiene gracias a un complejo multiproteico denominado Cohesina que actúa como un pegamento molecular (Losada 2008; Onn et al. 2008). Además, durante el proceso de replicación se generan entre las cromátidas hermanas uniones de ADN denominadas catenaciones que son consecuencia de la naturaleza semiconservativa del mecanismo de replicación (Sundin and Varshavsky 1980). Muchas de estas catenaciones se resuelven casi inmediatamente por enzimas que actúan sobre la topología del ADN, las topoisomerasas, pero se cree que un número indeterminado de ellas persiste hasta el momento de la segregación cromosómica, y contribuyen a la cohesión (Shamu and Murray 1992; Clarke et al. 1993).

El proceso por el cual se produce el reparto equitativo del material genético entre dos células hijas se denomina mitosis. En la primera etapa de este proceso (*profase*) los cromosomas experimentan un gran cambio morfológico que consiste, por un lado, en la compactación de la cromatina (o condensación), y por otro, en la reorganización de la cohesión (resolución). El resultado es un cromosoma visible como entidad individual bajo el microscopio, en el que se reconocen las dos cromátidas hermanas una al lado de la otra. En paralelo tiene lugar la nucleación de los microtúbulos, que ocurre principalmente a partir de los centrosomas, situados en polos opuestos de la célula, y que acaban generando el huso acromático (Gadde and Heald 2004). Al romperse la membrana nuclear los microtúbulos invaden el espacio nuclear. Además, en cada cromátida se ensambla una estructura proteica denominada cinetocoro que media la interacción entre cromosomas y microtúbulos. Durante la *prometáfase* se completa la formación del huso y los cromosomas se mueven empujados por los microtúbulos hasta colocarse en el ecuador de la célula, lo que marca la entrada en *metáfase*. En este momento los cromosomas están bajo tensión: por una lado, los microtúbulos anclados en los cinetocoros tiran de las cromátidas hermanas hacia polos opuestos del huso; por otro, la cohesión entre las cromátidas hermanas impide su separación. Esta situación se conoce como biorientación. Una vez que la célula se asegura de que todos los

cromosomas están biorientados se pone en marcha la *anafase*, regulada por una cascada de señalización en la que la proteólisis juega un papel esencial. El resultado es la disolución de la cohesión entre las cromátidas hermanas, de modo que éstas pueden migrar hacia los polos. A continuación, en *telofase*, se produce la descondensación cromosómica, la membrana nuclear se forma alrededor de los dos grupos cromosómicos y la división del citoplasma celular (citocinesis) da lugar a la formación de dos células hijas.

Entender los mecanismos que aseguran la correcta segregación cromosómica durante mitosis es importante desde el punto de vista del conocimiento básico, pero también en el terreno de la biomedicina. Los fallos en este proceso pueden generar células aneuploides, esto es, con un número incorrecto de cromosomas. La aneuploidía es causa de muchas enfermedades congénitas y parece tener también un papel importante en el proceso de tumorigénesis (Rajagopalan and Lengauer 2004). Por otro lado, la célula cancerígena es, ante todo, una célula en división. La mitosis es probablemente el momento del ciclo celular en que la célula es más vulnerable. De hecho, varias clases de agentes antineoplásicos de uso clínico (taxol, vinca-alcaloides, etopósido) parecen actuar inhibiendo la progresión mitótica (Perez de Castro et al. 2007). Un conocimiento detallado de los mecanismos que rigen la división celular puede no sólo ayudarnos a entender el modo de acción de estas drogas y mejorar así la especificidad de los tratamientos, sino también proporcionar dianas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El trabajo que se recoge en esta Tesis está dirigido a entender el papel de la proteína HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) en la regulación de la segregación cromosómica, y en particular del fenómeno de cohesión mediado por la Cohesina.

1. Cohesión regulada por Cohesina

1.1 Arquitectura de la Cohesina

El complejo Cohesina está compuesto por cuatro proteínas: Smc1, Smc3, Scc1/Rad21 y SA/Scc3 (Fig. 1A; (Losada and Hirano 2005). Smc1 y Smc3 pertenecen a una familia muy conservada de ATPasas cromosómicas denominada SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*). En organismos eucariotas se han descrito seis proteínas SMC. Estas proteínas aparecen como heterodímeros que se asocian con subunidades adicionales para formar tres complejos diferentes que participan en aspectos fundamentales de la biología del cromosoma (Hirano 2006):

INTRODUCCIÓN

- Smc1 y Smc3 forman parte del complejo Cohesina, como se acaba de mencionar, y hablaremos de él más adelante.
- Smc2 y Smc4 se encuentran en el complejo Condensina, que juega un papel esencial en la condensación cromosómica.
- Smc5 y Smc6, cuyas secuencias son sustancialmente divergentes a las de las Smc1-4, aparecen en un complejo implicado en reparación del ADN y mecanismos de respuesta al daño.

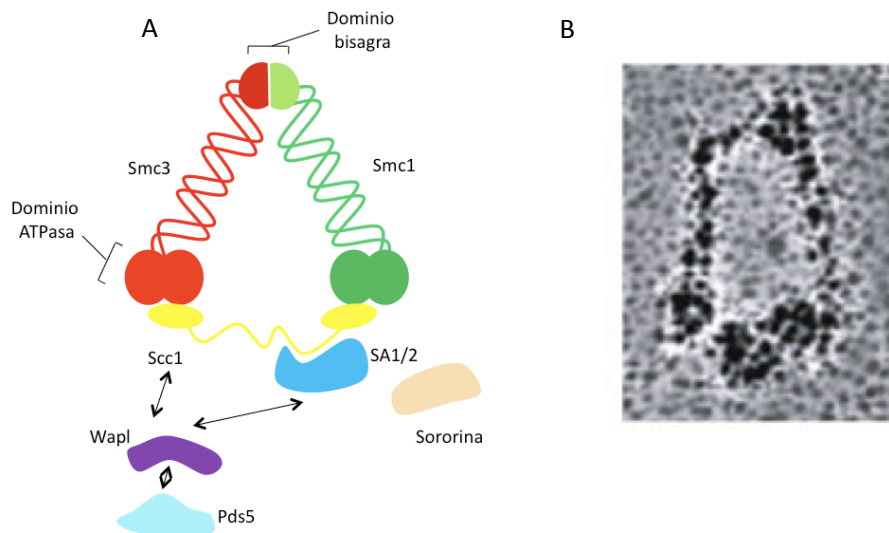


Figura 1: (A) Representación esquemática de la estructura de la Cohesina que muestra la posición relativa de sus subunidades Smc1, Smc3, Scc1 y SA1/2. Se indican los dominios de las proteínas SMC. Se Incluyen también proteínas asociadas al complejo y que regulan su función: Wapl, Pds5 y Sororina. La interacción de Wapl con la Cohesina depende de SA1/2, y Pds5 parece interactuar directamente con Wapl. En el caso de Sororina se desconoce cómo ocurre la interacción (adaptado de (Peters et al. 2008)). (B) Micrografía electrónica de un complejo Cohesina purificado de células humanas (Anderson et al. 2002).

Las proteínas SMC son polipéptidos de aproximadamente 150 kDa con dos dominios globulares en los extremos amino y carboxi-terminales desde los que se extienden sendas regiones *coiled-coil* separadas por un dominio bisagra. Estas moléculas se pliegan por el dominio bisagra, plegamiento que se estabiliza por interacciones entre las regiones *coiled-coil*, creando una molécula con un dominio con actividad ATPasa en un extremo y el dominio bisagra en el otro. Dos proteínas SMC interactúan a través de los dominios bisagra produciendo un dímero en forma de “V” (Fig. 1A). Experimentos bioquímicos realizados en levaduras sugieren que la subunidad Scc1 de la Cohesina se une a las regiones amino-terminal y carboxilo-terminal de Smc3 y Smc1, respectivamente. Se formaría así una estructura en forma de anillo de aproximadamente 50 nm de diámetro que en principio podría rodear una fibra de ADN de 10 nm de diámetro (Haering et al. 2002; Haering et al. 2004). Las imágenes de

microscopía electrónica de Cohesina purificada de células humanas apoyan la existencia de esta peculiar estructura en forma de anillo (Fig. 1B; (Anderson et al. 2002). La cuarta subunidad, SA/Scs3, se asocia al complejo a través de su interacción con Scs1. En células somáticas de vertebrados se han identificado dos variantes de la subunidad SA, SA1 y SA2, y se ha descrito también una subunidad SA3 que es específica de la línea germinal (Losada et al. 1998; Sumara et al. 2000; Prieto et al. 2001). De momento se desconoce la especificidad de los complejos Cohesina que contienen SA1 o SA2, si bien se ha propuesto recientemente que SA1 podría tener un papel específico en la cohesión telomérica (Canudas and Smith 2009). En cualquier caso, la proporción de ambos tipos de complejo parece estar regulado a lo largo del desarrollo, siendo Cohesina SA1 la forma predominante en estadios tempranos y Cohesina SA2 la más abundante en células somáticas (Losada et al. 2000).

Además de las cuatro subunidades que componen la Cohesina, se han descrito varias proteínas adicionales que interaccionan muy estrechamente con el complejo y probablemente modulan su comportamiento. Nos referimos a Pds5, Wapl y Sororina (Fig. 1A). Las tres aparecen en los inmunoprecipitados obtenidos de extractos de células humanas con anticuerpos anti-Cohesina (Sumara et al. 2000; Losada et al. 2005; Rankin et al. 2005; Gandhi et al. 2006; Kueng et al. 2006). Su función no parece necesaria para la carga de Cohesina en la cromatina, en tanto que su propia presencia en cromatina sí depende, en los tres casos, de la presencia de Cohesina. Pds5 y Wapl, pero no Sororina, están conservadas en levaduras (Panizza et al. 2000; Bernard et al. 2008; Sutani et al. 2009). Curiosamente, las consecuencias de eliminar la función de Pds5 y Wapl es muy diferente en levaduras y en células humanas. En *Saccharomyces cerevisiae*, Pds5 es esencial para mantener la cohesión. En células humanas, la eliminación de las dos versiones de Pds5, Pds5A o Pds5B, causa defectos leves de cohesión (Losada et al. 2005). En *Xenopus*, además, se observa un defecto en la disociación de Cohesina en profase (Shintomi and Hirano 2009). En cuanto a Wapl, su pérdida de función en levaduras origina defectos leves de cohesión, en tanto que en células humanas ocasiona un defecto agudo en la disociación de Cohesina (Gandhi et al. 2006; Kueng et al. 2006). Es posible que estos factores modulen la dinámica de apertura y cierre del anillo de Cohesina, y la importancia de esta función en un aspecto otro de la regulación del mecanismo de cohesión varíe de una especie a otra (Peters and Bhaskara 2009).

1.2 Modelo de funcionamiento de la Cohesina

En lo que se refiere al modo de acción de la Cohesina, el modelo más aceptado propone que la estructura tripartita que forman Smc1-Smc3-Scc1 rodea a las cromátidas hermanas, que quedarían así atrapadas dentro del anillo (Haering et al. 2002). Las siguientes evidencias experimentales apoyan este modelo “topológico”:

- La proteólisis tanto de Scc1 como de Smc3 destruye la integridad del anillo y provoca su disociación de la cromatina (Uhlmann et al. 1999; Gruber et al. 2003).
- La linearización de un minicromosoma circular con enzimas de restricción provoca igualmente la disociación de la Cohesina sin requerir proteólisis de ninguna de sus subunidades (Ivanov and Nasmyth 2005).
- La fusión de Smc1 y Smc3 a través de sus dominios bisagra impide la unión de la Cohesina a la cromatina, lo cual está de acuerdo con la idea de que el anillo tiene que abrirse para poder asociarse a la cromatina (Gruber et al. 2006).
- Si una vez que la Cohesina se ha cargado en la cromatina se estabiliza la interacción entre sus subunidades mediante entrecruzamiento in vitro, la Cohesina no puede disociarse de la cromatina ni siquiera en condiciones desnaturalizantes (Haering et al. 2008).

Existen no obstante modelos alternativos para explicar cómo la Cohesina lleva a cabo su función. Entre ellos destaca el modelo de esposas (*handcuff*), basado en resultados de interacción entre subunidades. Este modelo propone que dos moléculas de Cohesina, cada una presente en una cromátida hermana, interaccionarían entre sí a través de la subunidad Scc1/Rad21 para promover la cohesión (Zhang and Pati 2009). Esta interacción se vería estabilizada por la presencia de una única molécula de SA1/2.

Es posible que existan diferentes formas de unión de la Cohesina a la cromatina en distintas regiones cromosómicas, y diferentes modos de establecer cohesión (Losada 2007). A este respecto cabe señalar que en el locus MAT de levadura, cada anillo de Cohesina parece atrapar una única cromátida e interactúa con factores de silenciamiento de la otra cromátida para de esta manera establecer la cohesión en esta región (Chang et al. 2005; Huang et al. 2005).

1.3 Regulación de la Cohesina en el ciclo celular

Dado el importante papel que desempeña la Cohesina, no es de extrañar que su dinámica de asociación y disociación se encuentre cuidadosamente regulada. En el esquema de la Figura 2

se señalan los principales elementos de dicha regulación, que se resumen en los siguientes subapartados.

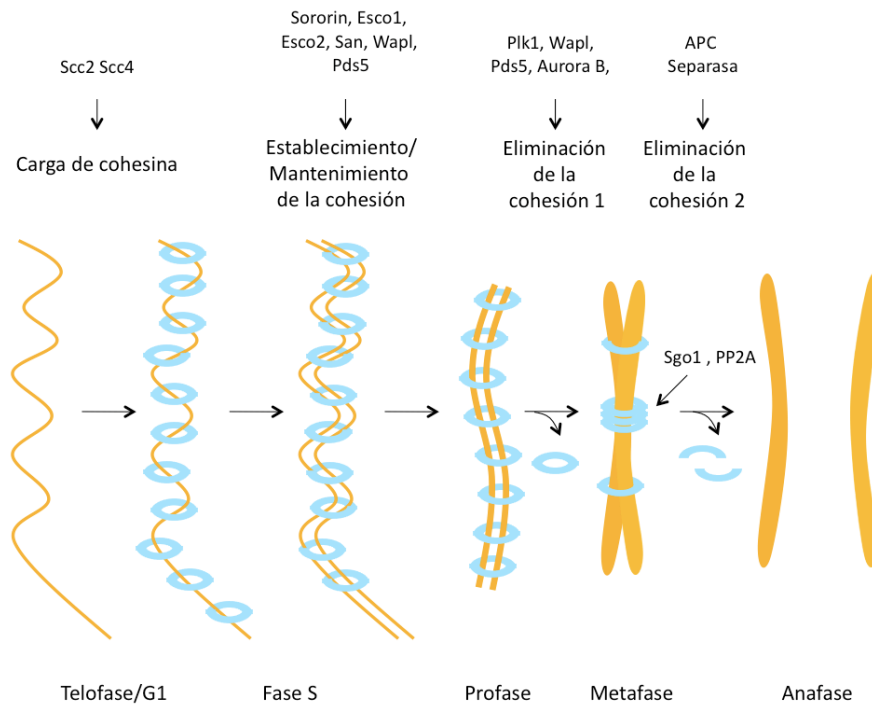


Figura 2: Modelo de la regulación de la Cohesina durante el ciclo celular en vertebrados. La carga de Cohesina ocurre en telofase/G1 y es dependiente del complejo Scc2-Scc4. Durante la replicación tiene lugar el establecimiento de la cohesión, proceso en el que participan numerosas proteínas entre las que destacan las acetiltransferasas Esco1, Esco2 y San. El mantenimiento de la cohesión depende, al menos en parte, de Pds5 y Sororina. Durante profase la mayor parte de la Cohesina se disocia de los brazos del cromosoma y esta disociación depende, fundamentalmente, de las quinasas Plk1 y Aurora B, de Wapl y de Pds5. Una pequeña fracción de Cohesina permanece en los centrómeros, protegida de la disociación por Sgo-PP2A. En anafase, la Separasa elimina la Cohesina centromérica, previa degradación de la Secarina por el complejo APC, y tiene lugar la separación de las cromátidas hermanas (Peters et al. 2008).

1.3.1 Carga de la Cohesina

En levaduras, la Cohesina se asocia al ADN al final de la fase G1 (Guacci et al. 1997; Michaelis et al. 1997), mientras que en células de vertebrados la carga de Cohesina ocurre en telofase (Losada et al. 1998; Darwiche et al. 1999; Sumara et al. 2000; Gerlich et al. 2006). A pesar de estas diferencias, en todos los organismos estudiados esta asociación depende de un heterodímero formado por dos proteínas: Scc2 y Scc4. Se desconoce el mecanismo molecular por el que Scc2-Scc4 facilita la unión de la Cohesina a la cromatina, si bien se ha propuesto que el heterodímero podría promover la hidrólisis de ATP por Smc1 y Smc3 y esto estimularía la apertura del anillo (Arumugam et al. 2003; Weitzer et al. 2003). Dicha apertura podría tener

lugar mediante la separación de los dominios bisagras (Gruber et al. 2006; Milutinovich et al. 2007).

Por otro lado, la carga de Cohesina en extractos de *Xenopus* requiere la presencia en cromatina de complejos pre-replicativos (pre-RC) (Gillespie and Hirano 2004; Takahashi et al. 2004) que reclutan a Scc2-Scc4 a través de la quinasa Cdc7 (Takahashi et al. 2008). En *S. cerevisiae*, no existe este requerimiento (Uhlmann et al. 1999) y posiblemente tampoco en células humanas (A. Ibarra 2009, Tesis Doctoral), por lo que es posible que sea específico de estadios embrionarios.

1.3.2 Distribución genómica de la Cohesina

El mapeo de la distribución genómica de la Cohesina y Scc2 en *S. cerevisiae* mediante la técnica de *ChIP-on-chip* (*Chromatin immunoprecipitation on chip*) reveló que no colocalizan, y que la Cohesina se une preferentemente a sitios donde convergen unidades de transcripción (Glynn et al. 2004; Lengronne et al. 2004). En base a estos resultados se propuso que Scc2-Scc4 interaccionaría con Cohesina en sitios de carga, pero posteriormente la maquinaria de transcripción empujaría el anillo de Cohesina hacia el final de los genes. Una publicación reciente, sin embargo, muestra que Scc2 y Cohesina sí colocalizan en los sitios de deposición, poniendo en duda dicho modelo (Kogut et al. 2009).

En *Drosophila*, los sitios de unión de Scc2 (Nipped-B) y Cohesina sí coinciden, y se encuentran principalmente en regiones transcripcionalmente activas (Misulovin et al. 2008). Los autores de este estudio sugieren que la transcripción podría facilitar la carga de Cohesina al proporcionar una fibra de cromatina de 10 nm, cuyas dimensiones se ajustan al diámetro del anillo. En células humanas, los sitios de unión de Scc2 no han sido identificados, pero sí los de Cohesina. En este caso, un 49% de los 8.811 sitios de Cohesina mapeados a lo largo del genoma (excluyendo regiones de ADN repetido) se encuentran en zonas intergénicas, un 35% en intrones y un 13% a una distancia menor de 5 Kb del comienzo o el final de genes (Wendt et al. 2008). La mayoría de estas secuencias son también sitios de unión de CCCTC (o CTCF), un factor “aislante” que participa la organización de dominios de expresión génica. La acumulación de Cohesina y CTCF en los sitios comunes para ambos es interdependiente, y la regulación transcripcional que ejerce CTCF depende de la Cohesina (Hadjur et al. 2009). En cambio, la falta de CTCF no parece afectar a la función de Cohesina en cohesión (Wendt and Peters 2009).

1.3.3 Establecimiento de la cohesión en fase S

La asociación de Cohesina a cromatina y el establecimiento de la cohesión son dos procesos distintos que pueden separarse temporalmente. Como se ha mencionado en un apartado anterior, la carga de Cohesina ocurre en telofase/G1 (en vertebrados) mientras que el establecimiento de la cohesión sólo puede ocurrir durante o después de la replicación. Un factor fundamental para este proceso es Eco1/Ctf7. Identificada inicialmente en *S. cerevisiae*, Eco1 es una acetiltransferasa que se asocia con el PCNA, factor de procesividad de la ADN polimerasa, y con componentes del RF-C (*Replication Factor-C*), que carga el PCNA en cromatina (Skibbens et al. 1999; Toth et al. 1999). Eco1 viaja con las horquillas de replicación, y su función se restringe a la fase replicativa, aunque también es importante para la cohesión que se establece en G2 cuando las células sufren daño en el ADN (Lengronne et al. 2006; Strom et al. 2007; Strom and Sjogren 2007; Unal et al. 2007). En *Drosophila* dos acetiltransferasas, Deco (ortólogo de Eco1) y San, participan en el establecimiento de la cohesión (Williams et al. 2003). En células humanas existen proteínas similares a Eco1 (EFO1/ESCO1 y EFO2/ESCO2) y a San, con funciones aparentemente no redundantes, pues su eliminación mediante siRNA causa defectos de cohesión (Hou and Zou 2005; Hou et al. 2007). Otra evidencia de la importancia de estas acetiltransferasas en el establecimiento de la cohesión la proporcionan los pacientes con el síndrome de Roberts, una enfermedad congénita relacionada con mutaciones en ESCO2. En las células de estos pacientes se han observado defectos de cohesión centromérica (Vega et al. 2005).

Actualmente se está empezando a entender el mecanismo por el que tiene lugar el establecimiento de la cohesión (Peters and Bhaskara 2009; Uhlmann 2009). Eco1 acetila a la subunidad Smc3 de la Cohesina, acetilación que es esencial para la viabilidad celular (Ben-Shahar et al. 2008; Zhang et al. 2008; Rowland et al. 2009). Sin embargo, la falta de Wapl o Pds5 hace dispensable la función de Eco1 (Tanaka et al. 2001; Ben-Shahar et al. 2008; Rowland et al. 2009; Sutani et al. 2009). En base a estos y otros resultados bioquímicos se ha propuesto que Wpl1 (el homólogo de Wapl en *S. cerevisiae*)-Pds5 actúan como un cierre de seguridad del anillo de Cohesina que dificultaría el establecimiento de la cohesión durante la replicación. La acetilación de Smc3 por Eco1 desestabilizaría la interacción de Cohesina con Wapl-Pds5, relajando el cierre y permitiendo así la formación de estructuras cohesivas (Rowland et al. 2009). Un trabajo reciente sugiere que esta desestabilización de la Cohesina mediada por la acetilación de Smc3 es además importante para permitir el avance de las horquillas de replicación en células humanas (Terret et al. 2009). En este caso, la eliminación de Wpl1 o

Pds5A también es capaz de rescatar el defecto en la progresión de horquillas que se observa en ausencia de ESCO1 o ESCO2.

1.3.4 Disociación de la Cohesina en mitosis

Mientras que en levaduras las Cohesinas permanecen asociadas a la cromatina hasta metafase, en metazoos la mayoría de las Cohesinas se disocian en profase. Sólo una pequeña población permanece en los cromosomas en metafase, principalmente en la región centromérica (Losada et al. 2000). La disociación en profase requiere la fosforilación de la subunidad SA por la quinasa Polo (*Polo-like-kinase* o Plk1, (Sumara et al. 2002; Hauf et al 2005) y la función de la quinasa Aurora B, cuya diana de fosforilación en este proceso se desconoce (Losada et al. 2002; Gimenez-Abian et al. 2004). La acción de Wapl es crucial para liberar la Cohesina, y en menor medida se requiere también Pds5 (Gandhi et al. 2006; Kueng et al. 2006; Shintomi and Hirano 2009). Una proteína denominada *Shugoshin* (Sgo) protege a la Cohesina centromérica de la disociación de profase. En células humanas existen dos proteínas de esta familia implicadas en cohesión, Sgo1 y Sgo2. En el caso de Sgo2 existen discrepancias sobre si realmente regula la cohesión centromérica (Kitajima et al. 2006) o si su principal función es corregir las uniones “erróneas” entre cinetocoros y microtúbulos, esto es, las que no conducen a la biorientación del cromosoma (Huang et al. 2007). Sgo2 es esencial en meiosis, pero no en mitosis, al menos en ratones (Llano et al. 2008). En cambio, el papel de Sgo1 en la protección de la Cohesina centromérica es claro (Salic et al. 2004; Kitajima et al. 2005; McGuinness et al. 2005). Sgo1 se concentra en los centrómeros de los cromosomas mitóticos y recluta a la fosfatasa PP2A, cuya actividad contrarresta la fosforilación de la subunidad SA por Plk1, evitando así la disociación de Cohesina (Kitajima et al. 2006; Riedel et al. 2006; Tang et al. 2006). La localización de Sgo1 en los centrómeros depende de las proteínas Bub1 y Aurora B (Kitajima et al. 2005; Rivera and Losada 2009).

Además de los mencionados, otros factores que afectan a la disociación de Cohesina en profase son:

- Haspin, quinasa que fosforila a la histona H3 en la Treonina 3, cuya eliminación genera separación prematura de cromátidas hermanas (*Premature Separation of Sister Chromatids, PSSC*) en tanto que su sobreexpresión rescata los fenotipos observados en ausencia de Sgo1 (Dai et al. 2006). Se desconoce si la fosforilación de H3 dificulta la disociación de la Cohesina, o si afecta la unión a cromatina de un regulador de la Cohesina.

- Prohibitin 2 (PHB2), cuya falta también causa PSSC en mitosis sin afectar a la localización de Sgo1, un fenotipo rescatado por la co-eliminación de Plk1 (Takata et al. 2007).
- HDAC3, una deacetilasa de histonas a falta de la cual se produce un fenotipo de PSSC que se rescata en ausencia de Plk1 o Aurora B, y que es necesaria para la correcta localización de Sgo1 en los centrómeros (Eot-Houllier et al. 2008).

La disolución total de la cohesión tiene lugar en anafase, una a vez que todos los cromosomas están correctamente biorientados y formando la placa metafásica. Una cisteín-proteasa llamada Separasa corta la subunidad Scc1 de la Cohesina, destruyendo así la integridad del anillo y provocando su liberación (Uhlmann 2001). La activación de Separasa necesita la acción del complejo APC (*Anaphase Promoting Complex*) que conduce a la ubiquitinación y consiguiente degradación de los inhibidores de la Separasa: Securina y ciclina B (Peters 2002). La Separasa es capaz de escindir todos los complejos Cohesina presentes en el cromosoma, tanto a lo largo de los brazos como en el centrómero, incluso en células carentes de Wapl (Kueng et al. 2006) o que expresan una versión no fosforilable de SA2 (Hauf et al. 2005). Sin embargo, no es capaz de escindir la Cohesina soluble porque su actividad es dependiente de cromatina (Sun et al. 2009).

1.4 Cohesión mediada por catenaciones

Las catenaciones del ADN constituyen un entrelazamiento físico entre las cromátidas hermanas y fueron el primer mecanismo propuesto para explicar el fenómeno de cohesión (Murray and Szostak 1985). Estas uniones son producto indirecto e inevitable de la replicación semiconservativa del ADN y su eliminación corre a cargo de la topoisomerasa II (topo II). La inhibición de esta enzima puede rescatar la separación prematura de las cromátidas hermanas en ausencia de Cohesina, lo que sugiere que efectivamente las catenaciones contribuyen a la cohesión (Vagnarelli et al. 2004; Toyoda and Yanagida 2006). Sin embargo, en minicromosomas de levadura las catenaciones no son necesarias para mediar la cohesión (Ivanov 2007, Koshland & Hartwell 1987). En embriones sincitiales de *Drosophila* parados en metafase mediante inhibición del complejo APC, el corte artificial de la Cohesina es suficiente para provocar la separación de las cromátidas hermanas (Oliveira 2009, en prensa). Este resultado sugiere de nuevo que las catenaciones no son el único mecanismo para mantener la cohesión en ausencia de Cohesina si la topo II está activa.

Es probable que, en condiciones fisiológicas (sin parar las células en metafase), algunas catenaciones persistan hasta anafase (Shamu and Murray 1992; Clarke et al. 1993). A favor de esta idea está la localización PICH (*Plk1-interacting checkpoint helicase*), una ATPasa de la familia SNF2, en hilos de ADN que se observan entre cinetocoros hermanos al comienzo de anafase (Baumann et al. 2007; Spence et al. 2007; Wang et al. 2008). Estos hilos corresponden a ADN centromérico y su resolución requiere la actividad de topo II (Baumann et al. 2007; Spence et al. 2007; Wang et al. 2008). Por otro lado, resultados recientes apuntan a que la actividad y/o localización centromérica de topo II en mitosis se regula por sumoilación tanto en levaduras como en vertebrados, y esta regulación podría a su vez modular el proceso de decatenación (Diaz-Martinez et al. 2008). Por ejemplo, la inhibición de PIASy, una enzima E3 de la familia de las sumo ligasas, provoca un largo arresto en metafase en células humanas incluso en ausencia de Sgo1 (Diaz-Martinez et al. 2006).

2. Papel de la heterocromatina en la regulación de la cohesión

2.1 ¿Qué es la heterocromatina?

“Heterocromatina” es el término acuñado por Heitz en 1928 (Passarge 1979) para describir los segmentos cromosómicos –a veces cromosomas enteros- que permanecían condensados una vez finalizada la división celular, durante interfase. Más tarde, (Brown 1966) distinguiría entre dos tipos de heterocromatina: la heterocromatina *facultativa*, que varía su estado de condensación en distintos tipos celulares o etapas del desarrollo, y la heterocromatina *constitutiva*, que aparece en idéntica posición en los dos cromosomas homólogos de todas las células como una identidad estructural permanente. En esta tesis nos referimos fundamentalmente a esta última al hablar de heterocromatina.

La heterocromatina supone una porción considerable del genoma de la mayoría de organismos eucariotas (alrededor del 30% en humanos). Históricamente, se ha definido por las siguientes características: niveles reducidos de recombinación meiótica, baja actividad transcripcional, capacidad de inactivar de forma estocástica y heredable la transcripción de genes trasladados a las inmediaciones de una región de heterocromatina mediante reordenamientos cromosómicos (fenómeno que se conoce como PEV, *Position Effect Variegation*) y replicación tardía en fase S (Henikoff 2000). La heterocromatina se compone en gran medida de secuencias repetidas, sobre todo ADN satélite y transposones, y contiene pocos genes. La heterocromatina posee también un perfil característico de modificaciones de histonas (Grewal Jia 2007). En la última década ha quedado claro que distintas modificaciones

post-traduccionales en la cola N-terminal de las histonas están involucradas en distintos procesos de la dinámica cromosómica que incluyen el control de la expresión génica y la segregación. La naturaleza combinatoria de estas modificaciones hace que se pueda hablar de un código de histonas: una combinación concreta de modificaciones en las histonas se traduce en un estado de la cromatina y por tanto en un efecto en la célula (Jenuwein and Allis 2001; Santos-Rosa and Caldas 2005).

La visión clásica de la heterocromatina como un desierto sin actividad génica ha ido transformándose en los últimos años. Además de contener dominios transcripcionalmente activos, está claro que la heterocromatina juega un papel esencial en la estructura y función cromosómicas. En particular, la heterocromatina está presente en dos elementos fundamentales para la transmisión del material genético, el telómero y el centrómero. Los telómeros son estructuras especializadas que estabilizan los extremos de los cromosomas lineales, y en la mayoría de los eucariotas consisten en un número variable de repeticiones de una secuencia muy corta (5-8pb) (Schoeftner and Blasco 2009). El centrómero es la región que dirige el ensamblaje del cinetocoro, una compleja estructura proteica que media la interacción del cromosoma con los microtúbulos del huso y participa activamente en su movimiento durante la división celular. Además, en muchos organismos el centrómero es un elemento clave en la cohesión entre cromátidas hermanas (Cleveland et al. 2003).

2.2 La heterocromatina pericentromérica

Con la excepción de una secuencia de 125 pb que constituye el centrómero de *S. cerevisiae*, no es la secuencia primaria del ADN sino mecanismos epigenéticos los que especifican la función centromérica (revisado en (Allshire and Karpen 2008). Los centrómeros de los tres cromosomas de *S. pombe* son distintos, ocupan 40-100 kb, y contienen secuencias repetidas. En la mayoría de los organismos eucariotas superiores estudiados, las regiones centroméricas se encuentran inmersas dentro de grandes bloques de heterocromatina (0.3-5 Mb en células humanas). Una prueba concluyente del carácter epigenético de los factores que determinan la identidad centromérica son los denominados neocentrómeros, centrómeros que se generan en regiones de eucromatina, carentes por tanto de secuencias repetidas, y en muchos casos transcripcionalmente activas (Amor et al. 2004).

A pesar de estas diferencias entre los centrómeros de los distintos organismos, existen una serie de características comunes (Cleveland et al. 2003). Estos se organizarían en dos dominios: El dominio central, caracterizado por poseer una variante de la histona H3

INTRODUCCIÓN

denominada CENP-A, que determinaría la nucleación del cinetocoro. Este dominio estaría flanqueado por otro dominio de cromatina, que en el caso de *S. cerevisiae* sería una sucesión de nucleosomas altamente en fase, y en otros organismos (metazoos y *S. pombe*) sería un dominio de heterocromatina (también conocida como heterocromatina pericentromérica). Este último dominio es el que se vería implicado en la cohesión centromérica.

En *S. pombe*, el dominio central contiene la variante de la histona H3 Cnp1/Sim4 (homóloga a CENP-A), el dominio de heterocromatina presenta una serie de características que le diferencian de la eucromatina: Los extremos N-terminales de las histonas H3 y H4 se encuentran hipoacetilados, la lisina 9 de la histona H3 se encuentra hipermetilada y aparece la proteína Swi6 que se une a esta lisina (Pidoux and Allshire 2005).

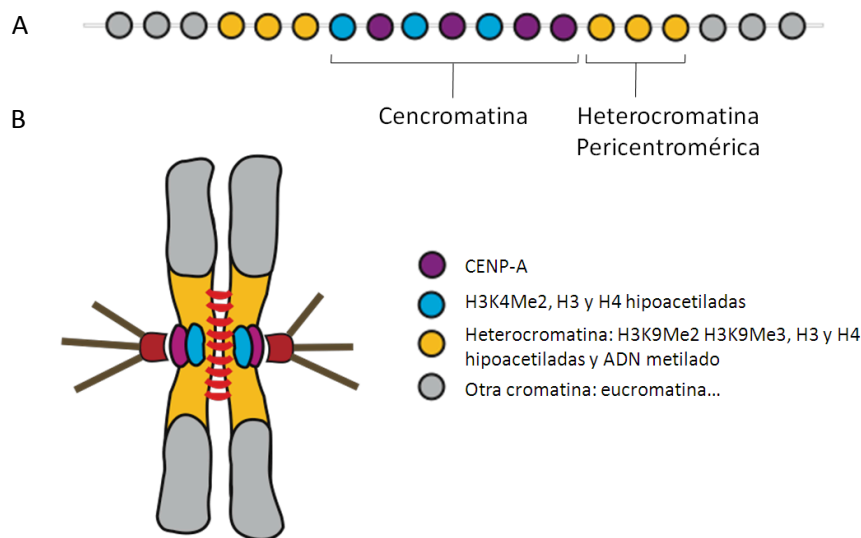


Figura 3: Esquema del centrómero de metazoos. (A) Distribución lineal de las marcas epigenéticas en una fibra de cromatina de la región centromérica. El dominio central o de cencromatina se encuentra constituido por nucleosomas de CENP-A (morado) que se alternan con nucleosomas que contienen H3K4Me2 (azul). Flanqueando este dominio hay dos dominios de heterocromatina pericentromérica caracterizado por H3K9Me3, hipoacetilación de histonas, ADN metilado y HP1 **(B)** Representación de la disposición tridimensional de la misma fibra. (Allshire and Karpen 2008).

En metazoos la histona H3 es reemplazada también por su variante CENP-A. CENP-A constituye la marca epigenética que determina la identidad centromérica (revisado en (Bernad et al. 2009). CENP-A y la histona H4 forman tetrámeros más compactos y rígidos que los correspondientes tetrámeros de H3-H4. Así, la CENP-A confiere a los nucleosomas que la contienen (nucleosomas-CENP-A) una rigidez estructural que posiblemente determine, al menos en parte, la propagación de la identidad centromérica (Black et al. 2004). Por otro lado,

estudios funcionales en diversos organismos resaltan la importancia de CENP-A en la orquestación del ensamblaje del resto de las proteínas del cinetocoro (por ejemplo, (Blower and Karpen 2001) (Fukagawa et al. 2001) (Oegema et al. 2001). Al contrario de lo que ocurre en *S. pombe*, los nucleosomas que contienen CENP-A se encuentran en subdominios que alternan con subdominios de nucleosomas que contienen la histona H3 (en concreto, histona H3 dimetilada en la lisina 4). Ambos subdominios forman conjuntamente lo que se conoce como cromatina centromérica (o cencromatina, Fig. 3A). La cencromatina se encuentra flanqueada por dominios de heterocromatina caracterizados por la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3, hipoacetilación de las histonas H3 y H4, y metilación del ADN (Sullivan et al. 2001; Sullivan and Karpen 2004). También aparece la proteína HP1 homóloga a la Swi6 de levaduras (Fig. 3A). La cencromatina y la heterocromatina pericentromérica se encuentran separados por una región de cromatina caracterizada por la H3K9 dimetilada (Lam et al. 2006). Esta fibra lineal se dispondría en una estructura tridimensional como la de la figura 3B.

2.3 La proteína HP1

HP1 fue identificada originalmente en *Drosophila* en una búsqueda de proteínas nucleares que se localizaban preferentemente en el cromocentro de los cromosomas politénicos, una estructura constituida por la agregación de los centrómeros de todos los cromosomas (James and Elgin 1986; Eissenberg et al. 1990). Análisis genéticos posteriores determinaron que HP1 actúa como supresor del fenómeno de PEV (James and Elgin 1986; Eissenberg et al. 1990). Esta proteína está muy conservada y existen homólogos en la mayoría de organismos eucariotas, con la notable excepción de *S. cerevisiae* (Maison and Almouzni 2004). La levadura *S. pombe* contiene una única proteína HP1, en tanto que se han descrito hasta cinco isoformas en otras especies animales. Las proteínas HP1 están codificadas por una clase de genes conocidos como *chromobox* (CBX) (Lomberg et al. 2006b). En mamíferos existen tres isoformas de HP1, codificadas por tres genes distintos: HP1 α (CBX5), HP1 β (CBX1) y HP1 γ (CBX3). Curiosamente, además de los tres genes principales se han identificado numerosos pseudogenes. Así por ejemplo, en humanos existe un pseudogén para CBX5, al menos 5 pseudogenes para CBX1, y 11 pseudogenes para CBX3. Esta cantidad de pseudogenes sugiere que las secuencias tipo HP1 han sido duplicadas varias veces durante la evolución.

Las proteínas HP1 son pequeñas (alrededor de 25 kDa) y forman parte de una superfamilia de proteínas caracterizada por tener un dominio de organización de cromatina denominado *chromodomain* o cromodominio (Jones et al. 2000). Las proteínas que contienen

INTRODUCCIÓN

este dominio son capaces de modificar la estructura de la cromatina para asemejarla a heterocromatina. El *chromodomain* se localiza en la región N-terminal de HP1, mientras que en su región C-terminal aparece un segundo dominio llamado *chromoshadow*, que es único de la familia HP1 (Fig. 4). Estos dos dominios son bastante similares en la secuencia de aminoácidos, aunque tienen funciones distintas. El *chromodomain* permite a HP1 reconocer y unirse a lisina 9 metilada de la histona H3 (H3K9Me) (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001). El dominio *chromoshadow* media la homo- y heterodimerización de las proteínas HP1, necesaria para la unión de HP1 con la cromatina, y su interacción con otras proteínas como p150 CAF1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) – subunidad principal de un complejo que incorpora histonas durante la replicación del ADN-, Suv39h -metiltransferasa de la Lisina 9 de H3- o las ADN-metiltransferasas Dnmt1 y Dnmt3a (Maison and Almouzni 2004). Entre estas dos regiones hay una secuencia sin estructura definida denominada bisagra o *hinge*, y que contiene la secuencia de aminoácidos más variable entre proteínas HP1 de la misma especie o de distintas especies. Se ha propuesto que esta es la región más flexible y expuesta de HP1 (Singh and Georgatos 2002). Esta región es capaz de unir ARN, y esta capacidad es importante para la localización de HP1 en la heterocromatina (Maison et al. 2002; Muchardt et al. 2002). También puede unirse a ADN y cromatina sin especificidad de secuencia, al menos *in vitro* (Sugimoto et al. 1996; Meehan et al. 2003).

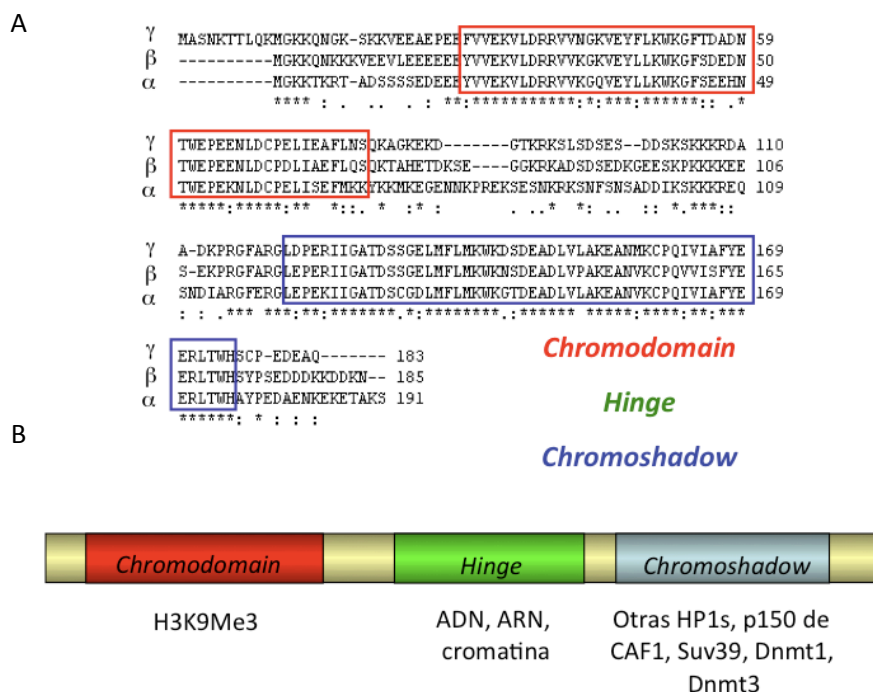


Figura 4: Secuencias y estructura de las HP1s humanas. (A) Secuencias de las tres isoformas de HP1 humanas α , β y γ indicándose en distintos colores las secuencias que corresponden a los distintos dominios. **(B)** Debajo de cada dominio se representa a las proteínas con las que es capaz de interaccionar HP1 (Maison and Almouzni 2004).

Como su propio nombre indica, HP1 se localiza fundamentalmente en la heterocromatina (Nielsen et al. 2001). La función más característica de HP1 es la formación de heterocromatina. Un posible modelo para describir este proceso en términos moleculares en *S. pombe* se esquematiza en la Figura 5. Durante la fase S, las secuencias repetidas del centrómero se transcriben, y los ARNs producidos activan la maquinaria del ARN interferente (*RNA interference*, RNAi o ARNi). Dicer procesa estos ARNs, generando oligonucleótidos (siRNAs, *small interference RNA*) que son reconocidos por el complejo RITS (*RNA-Induced Transcriptional Silencing Complex*), formado por proteínas de la familia *Argonaute*. Se promueve así el reclutamiento a la región centromérica de Clr4, una metil-transferasa de histonas que metila H3K9. Esta modificación proporciona una plataforma de unión para Swi6/HP1. Swi6, a su vez, recluta más Clr4 que metila a los nucleosomas adyacentes. Moléculas adicionales de HP1 se unen a estos nucleosomas. De esta forma se crea un ciclo de metilación de histona y reclutamiento de HP1 que propaga así la estructura de la heterocromatina (Grewal and Jia 2007). En mamíferos podría existir una forma similar de propagación de la heterocromatina. En este caso, además, tanto HP1 como Suv39h (el ortólogo de Clr4) son capaces de interactuar con ADN-metiltransferasas que metilan residuos de Citosina de dinucleótidos CpG, y esta metilación contribuye también a la heterocromatinización (Fuks et al. 2003).

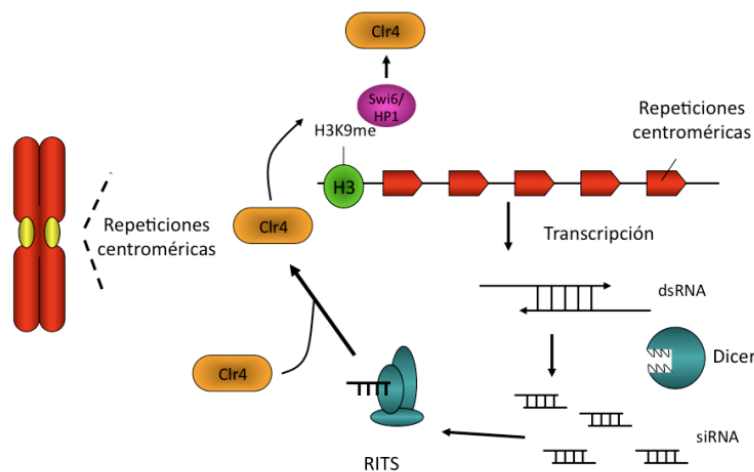


Figura 5: Modelo propuesto para la formación y propagación de la heterocromatina. Los transcritos no codificantes de las regiones pericentroméricas son procesados por Dicer generando siRNAs. Estos son incorporados en el complejo RITS que recluta a Clr4, la cual metila la histona H3 en K9. Esta modificación es reconocida por Swi6/HP1, que se une así a cromatina y recluta nuevas moléculas de Clr4 que modifican los nucleosomas vecinos. (White and Allshire 2004; Grewal and Jia 2007)

Gracias a su capacidad para interactuar con otras proteínas no histonas, HP1 se ha visto implicada en una multitud de procesos. Entre ellos destaca la regulación de la

transcripción, la senescencia, la replicación, o la reparación de daño al ADN (Luijsterburg et al. 2009). De particular interés para el trabajo de esta tesis es la interacción de la proteína HP1 de *S. pombe* con una subunidad de Cohesina, que se describe en detalle más adelante.

Las proteínas HP1 están presentes en la cromatina durante interfase, pero la mayor parte se disocia a la entrada en mitosis. Se ha propuesto que la fosforilación de la histona H3 en la serina 10 por Aurora B desestabiliza la unión de HP1 a la lisina 9 trimetilada y provoca su disociación (Fischle et al. 2005; Hirota et al. 2005). Sin embargo, una pequeña población de HP1 permanece unida a la región centromérica a lo largo de la mitosis. Se desconoce si proteínas presentes en esta región estabilizan la interacción de HP1 con H3K9Me3 a pesar de la fosforilación de la serina adyacente o si una población de HP1 se une a la cromatina centromérica por un mecanismo que no involucra interacción con H3K9Me3. En este sentido, cabe mencionar que una proteína HP1 α truncada, sin el *chromodomain*, es capaz de asociarse a los centrómeros de células humanas en mitosis, pero no en interfase (Hayakawa et al. 2003).

Por último, recientemente se ha descrito que las proteínas HP1 pueden ser objeto de múltiples modificaciones post-traduccionales que incluyen acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, de manera similar a las histonas (Leroy et al. 2009). Se ha propuesto que cada una de estas modificaciones podría especificar una particular función de HP1. Así, la fosforilación de la treonina 51 en HP1 β es necesaria para iniciar la reparación del ADN en las regiones de heterocromatina (Ayoub et al. 2008; Corpet and Almouzni 2009). La fosforilación de HP1 γ en la serina 93 parece ser necesaria para el reclutamiento de HP1 γ a los focos de senescencia (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*, SAHF) (Zhang et al. 2007a). Curiosamente, esta misma modificación se ha identificado como una marca de cromatina que se transcribe activamente (Lomberg et al. 2006a).

2.4 Cohesina y heterocromatina pericentromérica

El centrómero es el lugar del cromosoma donde se requiere una mayor cohesión, capaz de contrarrestar las fuerzas que ejercen los microtúbulos del huso que tiran de los cinetocoros hacia los polos. El mapeo de los sitios de unión de Cohesinas a lo largo de los cromosomas de levaduras muestra que éstas se acumulan en una región de 20-50 kb alrededor de centrómero, ya desde interfase (Blat and Kleckner 1999; Laloraya et al. 2000; Glynn et al. 2004; Lengronne et al. 2004). En *S. cerevisiae*, esta acumulación requiere la presencia de un cinetocoro funcional en cada ciclo celular y puede observarse también alrededor de un centrómero ectópico (Weber et al. 2004) (Eckert et al. 2007). Puesto que no existen secuencias repetidas ni

heterocromatina propiamente dicha en la región que rodea al centrómero de *S. cerevisiae*, el mecanismo de enriquecimiento centromérico de la Cohesina parece diferente del propuesto en *S. pombe*. En esta levadura, la presencia de secuencias de heterocromatina con nucleosomas que contienen H3K9Me3 que unen Swi6 es fundamental para la acumulación de Cohesina (Bernard et al. 2001; Nonaka et al. 2002). Mutantes *swi6* o en genes que codifican proteínas de la maquinaria de ARNi presentan defectos de segregación cromosómica como resultado de la pérdida de cohesión en la región centromérica (Hall et al. 2002). La Cohesina presente en los brazos cromosómicos no se ve afectada por la deficiencia de Swi6, y permite la viabilidad de los mutantes *swi6*. En estas células, sin embargo, la segregación cromosómica no funciona correctamente. La interacción directa entre Psc3 (el homólogo de la subunidad SA de la Cohesina) y Swi6 parece responsable de la presencia de Cohesina en la heterocromatina pericentromérica (Nonaka et al. 2002). Esta interacción podría estar regulada por Hsk1-Dpf1, una quinasa que fosforila a Swi6, pues su función es necesaria para la acumulación de Cohesina en el centrómero (Bailis et al. 2003). La expresión de una versión de Psc3 fusionada a dos dominios *chromodomain*, capaz de unirse a la heterocromatina centromérica en mutantes *swi6*, restaura la fidelidad de la segregación cromosómica en mitosis en estos mutantes (Yamagishi et al. 2008). Este resultado confirma la idea de que la heterocromatina pericentromérica es necesaria para el reclutamiento de Cohesina al centrómero y Swi6/HP1 es un elemento clave en este proceso.

En vertebrados también parece existir una estrecha relación entre heterocromatina pericentromérica y cohesión. Por ejemplo, cuando las células permanecen en prometafase por tratamiento con un inhibidor de la polimerización de microtúbulos como la colcemida, los cromosomas pierden progresivamente la cohesión de los brazos pero en cambio la mantienen en el centrómero (Giménez-Abián 2004). En células de *Drosophila* se puede observar este efecto en todos los cromosomas salvo el Y, compuesto mayormente por heterocromatina (Queiroz-Machado et al. 2001). Además, en células de mamífero, el orden en el que se separan los cromosomas en anafase tiene relación directa con la cantidad de heterocromatina pericentromérica que poseen, lo que sugiere una mayor cohesión a disolver en anafase (Vig 1987). Como se ha mencionado en apartados anteriores, la mayor parte de la Cohesina que se asocia a la cromatina en interfase se disocia durante mitosis. Las proteínas *Shugoshin*, que se acumulan en la región centromérica, protegen a la Cohesina de esta disociación. Se desconoce si la presencia preferente de Cohesina en los centrómeros de los cromosomas mitóticos se debe exclusivamente a esta protección o si, al igual que ocurre en levaduras, la Cohesina se acumula en la heterocromatina pericentromérica ya desde interfase. La presencia de Cohesina

en cromosomas metafásicos de *Drosophila* se extiende a ambos lados de la región del centrómero en la que se localiza Sgo/MEI-S332 (Valdeolmillos et al. 2004). Es probable por tanto que existan mecanismos de acumulación y/o protección de la Cohesina presente en la heterocromatina pericentromérica independientes de Sgo.

La pregunta que nos planteamos en esta tesis es si el papel de la heterocromatina, y en particular de HP1, en la regulación de la Cohesina, descrita en *S. pombe*, está conservado en células animales. Ciertas evidencias experimentales sugerían que podía ser así:

- En células de ratón se ha encontrado que el tratamiento con ribonucleasa altera la distribución de la marca H3K9Me3 y de HP1. Este resultado pone de manifiesto la importancia del ARN en la organización de la heterocromatina (Maison et al. 2002). De hecho, se ha detectado transcripción bidireccional de las repeticiones del ADN satélite *major*, el más abundante en la heterocromatina de los cromosomas de ratón (Lehnertz et al. 2003). Además, fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEFs) carentes de la metilasa Suv39h presentan una menor cohesión en la región ocupada por el satélite *major* (Guenatri et al. 2004).
- En *Drosophila*, mutaciones en los genes que codifican los componentes de la maquinaria del ARNi provocan una reducción de la metilación de H3K9 y la deslocalización de las proteínas HP1 (Pal-Bhadra et al. 2004).
- Un estudio en células DT40 de pollo ha revelado que la eliminación de Dicer provoca defectos en la organización de la heterocromatina, defectos de cohesión y alteraciones en la distribución de las Cohesinas en los cromosomas mitóticos (Fukagawa et al. 2004).
- Si bien no se ha observado una interacción entre HP1 y Cohesina, se ha identificado en Scc2/NPBL (el factor de carga de Cohesina) un motivo que interacciona fuertemente con el dominio *chromoshadow* de HP1 (Lechner et al. 2005).
- HDAC3, una deacetilasa de histonas a falta de la cual se produce un fenotipo de PSSC que se rescata en ausencia de Plk1 o Aurora B, y que es necesaria para la correcta localización de Sgo1 en los centrómeros (Eot-Houllier et al. 2008).

Por lo tanto, un modelo similar al de *S. pombe* según el cual la maquinaria de ARNi participaría en la organización de la heterocromatina y esta, a su vez, sería esencial para el reclutamiento y/o mantenimiento de la Cohesina en la región pericentromérica podría explicar la relación entre heterocromatina y cohesión en vertebrados (White and Allshire 2004).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este trabajo nos proponemos estudiar **el papel que tienen las proteínas HP1 en segregación cromosómica**, usando como modelo células humanas (HeLa). El plan de trabajo se puede por tanto dividir en dos objetivos:

1. Papel de HP1 en la regulación de la Cohesina, objetivo que podemos dividir en dos apartados:

- Eliminación de HP1 mediante siRNA y posterior estudio de la cohesión y la regulación de la Cohesina en células humanas.
- Tratamientos farmacológicos con drogas que alteran las marcas epigenéticas de la heterocromatina pericentromérica y la localización de HP1 y posterior estudio de la regulación de la Cohesina

2. Estudio de la fosforilación de la serina 93 de HP1 γ en mitosis:

- Búsqueda de la quinasa mitótica implicada en la fosforilación
- Papel funcional de la fosforilación de la serina 93 de HP1 γ en mitosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células y tratamientos con drogas

Las células HeLa se cultivaron en *Dulbeccos's Modified Eagle Medium*, DMEM (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone) y antibióticos (penicilina y estreptomycin), y se crecieron a 37°C y 5% CO₂. La línea celular HeLa que expresa la variante Scc1-Myc fue proporcionada por el grupo de J.M. Peters del *Institute of Molecular Pathology* (Hauf et al. 2005) y se creció en un medio similar al anterior pero con selección: higromicina (Invitrogen) a 100µg/mL y G418 (Sigma) a 200µg/mL. La expresión de Scc1-Myc es condicional y requiere adición de 2µg/mL Doxyciclina. Para los ensayos de inmunofluorescencia las células se crecieron en cristales preincubados con 0,1% de polilisina (Sigma) para aumentar la adhesión celular.

Para sincronizar células en las distintas fases del ciclo (G1/S, S y M) se siguió un protocolo de sincronización con doble bloqueo con timidina (Sigma): El día 1, las células se siembran a una densidad de ¼ en una placa p100. El día 2, 24 horas después de haber sembrado, se retira el medio y se añade nuevo con 2mM de timidina. El día 3, 14 horas después de haber añadido la timidina, se retira el medio y se añade medio de cultivo, 11 horas después se vuelve a añadir 2mM timidina. En el día 4, 13 horas después de haber añadido la timidina se recogen células que representaran la población arrestada en un estadio G1/S. Si se retira el medio, se añade medio fresco y se deja que las células proliferen durante 4 horas nos encontraremos una población celular mayoritariamente en fase S. Si en vez de esperar 4 horas esperamos 9 horas y en ese momento añadimos 0.1 µg/mL de colcemida (Sigma) y esperamos 2 horas, tendremos una población enriquecida en mitosis.

La tricostatina A o TSA (Sigma), un inhibidor de histonas deacetilasas y el 5-aza-2'deoxicitidina o AZA (Sigma), un inhibidor de ADN-metil-transferasas se disolvieron a 500µg/mL en DMSO y a 1mM en agua, respectivamente. Las células creciendo exponencialmente se trataron con las drogas durante 5 días a las concentraciones 30ng/mL para el TSA y 1µM para el AZA, renovándose cada día. En las células tratadas con el inhibidor de Aurora B, ZM447439 (Astra Zeneca), se usó una concentración de 2 µM durante 4 horas (en el caso de la figura 29C) y 2µM durante 16 horas (para la figura 29D). En este último caso las células estuvieron 24 horas en colcemida (tiempo solapó con las horas con ZM447439).

Western blot

Las fracciones proteicas se separaron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se lavaron con TBST (200mM Tris-HCl pH7.5, 1.5M NaCl (TBS), 0.5% Tween-20) y se incubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (5% leche en polvo en TBST). El anticuerpo primario se suministró diluido en una solución que contenía 1% BSA en TBST más 0.05 % azida sódica, mientras que el anticuerpo secundario con actividad peroxidasa (HRP, de Amersham Biosciences) se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo. Después de la incubación con cada anticuerpo se hicieron lavados con TBST. Tras la incubación con los anticuerpos las membranas se trataron con solución de detección ECL (Amersham Biosciences).

Inmunofluorescencia

Las células se fijaron con 2% de paraformaldehído o PFA (cuando de uso el anticuerpo anti- α tubulina se añadió al PFA 0,5% tritón X-100), se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0.2% tritón X-100. Tras una incubación de 30 minutos en solución de bloqueo (3% BSA en PBS), se añadieron los anticuerpos en solución de bloqueo y 1 hora después se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con FITC (*fluorescein isothiocyanato*) o *Texas Red* (ambos de Jackson Immunoresearch) usados a 1:200. Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (Sigma) a una concentración 1 μ g/mL. Vectashield (Vector) fue usado como medio de montaje. Para aquellas muestras que requerían preextracción el protocolo fue similar al mostrado anteriormente, se lavaron las células con PBS, después con CSK (10mM Pipes pH7, 0.1M NaCl, 0.3M sacarosa y 3mM MgCl₂) y a continuación con CSK-0.5% Tritón X-100 y 0.5mM PMSF durante 4 minutos. Por último se fijaron como se indica más arriba. Aquellas muestras a las que se administró choque hipotónico se arrestaron en 0.1 μ g/mL de colcemida durante 2 horas. Posteriormente se incubó con 60mM KCl durante 30 minutos previa a la fijación. Para la tinción con anticuerpo anti-Aurora A se llevó a cabo el protocolo normal con una post-fijación con metanol durante 10 minutos.

Para el observar la variante Scc1-Myc en células HeLa expresando con doxiciclina las células fueron arrestadas con 0.1 μ g/mL de colcemida durante 20 horas antes del análisis y después fueron preextraídas con 0.1% tritón X-100 en PBS durante 4 min a temperatura ambiente. Dado que no todas las células expresaban la proteína Scc1-Myc el porcentaje relativo de meafases Scc1⁺ se calculó con la formula siguiente: $100 \times I_c \times M_t / M_c \times I_t$ donde I

donde I es la fracción de interfases myc⁺, M es la fracción de metafases mostrando señal de myc entre los centrómeros marcados por CREST (como en la figura 14B).

Para la preparación de extensiones de cromosomas mediante citospin, las células fueron arrestadas en mitosis por tratamiento con colcemida durante 2-3 horas. Se lavaron con PBS y después se resuspendieron en una solución 75mM de KCl (que previamente había sido calentado a 37°C). Se añadió la solución con KCl gota a gota resuspendiendo progresivamente las células. Tras la resuspensión se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Finalmente se cargaron en las cámaras del citospin (modelo Citospin 3 Shandon) 10⁵ células en 100 µl. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min con la opción de aceleración y desaceleración lenta. Después de la centrifugación se incubaron las células con KCM (120mM KCl, 20mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.7, 0.5mM EDTA y 1% Tritón-X100) al menos 10 min. A continuación se bloquearon con 3% BSA-KCM durante 30 min. El anticuerpo 1º y 2º se pusieron en solución de bloqueo durante 1 hora cada uno. Los lavados se hicieron con KCM. Finalmente las células se fijaron con 2% PFA-KCM y se tiñeron los cromosomas con DAPI y se montaron con vectashield (Vector). En el caso de que el anticuerpo primario fuera contra la fosforilación de la serina 93 de HP1γ, todos los buffers del citospin contenían β-glicerofosfato 80mM (inhibidor de fosfatasas).

La adquisición de imágenes se llevó a cabo usando un microscopio LEICA con una cámara acoplada DFC-350-FX. El microscopio confocal que se usó era de LEICA, modelo SP5-MP.

Citometría

Se recogieron 5 x 10⁵ células para citometría y se lavaron con buffer EB (1% FBS en PBS). Tras lo cual se resuspendieron en 100 µL de buffer EB y se añadió etanol (100%) frío gota a gota agitando el tubo con el vortex despacio. Las células se fijaron como mínimo, una noche a 4°C. Antes del análisis se centrifugaron y se resuspendieron en PBS, 20µg/mL yoduro de propidio (Sigma) y 0.2mg/mL RNasa (Quiagen).

siRNA

Las células HeLa se sembraron a una densidad de 0.6 x 10⁵ células/mL para ser tratadas con el siRNA. Al día siguiente se transfectaron con oligofectamina (Invitrogen), con una concentración de siRNA de 100nM. Un día después se volvieron a transfectar otra vez con una concentración

de 100nM. Al día siguiente se sembraron y se pusieron células para analizar los niveles de proteína por *western blot* e inmunofluorescencia. Las secuencias de siRNA usadas son las siguientes:

siRNA	SECUENCIA (5'→3')	Compañía
HP1 α	UAACAAGAGGAAAUCCAUUUCUCA	Invitrogen
HP1 α -Y1	CCUGAGAAAAACUUGGAUUTT	Dharmacon
HP1 α -Y2	GGGAGAAGUCAGAAAGUAATT	Dharmacon
HP1 β	GGAUAAAGUGUUUCAAGGCAACCUUU	Invitrogen
HP1 γ	UCUUAACUCUCAGAAAGCUGGCAAA	Invitrogen
Aurora A	GCACAAAAGCUUGUCUCCA	Dharmacon
Aurora B	GAGCCUGUCACCCCAUCUG	Dharmacon

Los siRNA de Invitrogen son *Stealth* siRNA. Las células fueron analizadas 3 o 5 días después de la primera transfección en el caso de los siRNA contra HP1 α HP1 β o HP1 γ , y 3 días solo en el caso de los siRNA contra HP1 α -Y1, HP1 α -Y2, Aurora A o Aurora B.

Preparación de extractos de células HeLa

Protocolos para la preparación de extractos:

- La preparación de extractos nucleares de HeLa en la figura 9A y C se llevó a cabo de la siguiente manera: Se resuspendió el pellet de células HeLa en buffer osmótico (200mM KCl; 40mM Tris pH 7.5, 0.34M sacarosa, 10% glicerol, 1mM DTT, 1mM NaVO₄, 5mM β -glicerofosfato, 0.1mM PMSF, 5mM NaF, coctel de inhibidores de proteasa). Se dejaron las células a una concentración de 3×10^7 célula/mL. Se homogenizó usando un potter. Se verificó por microscopía la lisis celular y que los núcleos estaban intactos. Se centrifugaron los núcleos (1600 rpm 4 min 4°C) y se resuspendieron en buffer hipotónico. Se añadió 35 μ L de nucleasa *Micrococcus* a 0.2 U/ μ L y CaCl₂ a 10mM y se incubó 5 min a 25°C. Después de esto se añadió KCl a 200 mM y se incubó 20 min más a 20°C. Después se incubó 15 min a 4°C en la noria. La digestión se paro añadiendo EGTA 2mM. Se centrifugó a 16000g 20 min 4°C y se midió la concentración de proteína

- del sobrenadante por Bradford. Para la inmunoprecipitación se usaron 250 µg de extracto por inmunoprecipitación.
- Para la inmunoprecipitación con agentes entrecruzantes (figura 9B) se retiró el medio a las placas con células y se añadió 1% de formaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para parar el *crosslinking* se usó glicina a una concentración de 0.125 M y se lavó dos veces con PBS frío. Tras este paso, las células se levantaron y se lisaron usando buffer RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.5% ácido desoxicólico, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 20mM, 20mM β-glicerofosfato, 10mM β-mercaptoetanol, 1mM PMSF e inhibidores de proteasa). Tras 15 minutos en rotación a 4°C, el extracto se centrifugó durante 15 minutos a 14K rpm y se recogió el pellet. Este pellet se resuspendió en buffer de extracción de cromatina (10mM Tris-HCl a pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1.5mM MgCl₂, 0.25% sacarosa, 1mM PMSF e inhibidores de proteasas). Además las proteínas de la cromatina se solubilizaron al tratarlas con 0.2U/µL nucleasa micrococcal (concentración final 0.008U/µL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para parar la reacción se añadió 2mM EDTA y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual se recogió el sobrenadante. Esto último constituye el extracto de cromatina.
 - Para el caso de la figura 31 el extracto mitótico de células HeLa se preparó como sigue: Las células se resuspendieron en buffer de lisis (TBS 0.5% NP-40, 0.5 mM DTT, inhibidores de proteasa y 0.1mM PMSF). Se incubó 20-30 minutos en hielo con resuspensión ocasional y se sonicó durante 10 segundos 3 veces, en intervalos de 1 minuto. Después se añadió NaCl para dejar una concentración final 0.3M. Se dejó rotando durante 30 min a 4°C. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min (se puede centrifugar de nuevo si es necesario). Finalmente se añadió 1 volumen de agua y 1 volumen de buffer de dilución 2x (30% glicerol, 40 mM Tris pH 7.5, 1mM DTT; inhibidores de proteasas y 0.2 mM PMSF).

Inmunoprecipitación y pull-down

Para la inmunoprecipitación se unieron los anticuerpos a bolas de agarosa o *beads* con proteína A agarosa para anticuerpos de conejo y proteína G sefarosa para anticuerpos de ratón. Los extractos se incubaron 2 horas con los anticuerpos correspondientes y posteriormente la mezcla extracto-anticuerpo se incubó 1 hora. Finalmente se recuperó el complejo anticuerpo-*beads* y se analizó por *western blot*.

En el caso del *pull-down* se usaron proteínas recombinantes HP1 unidas a GST (en su región N-terminal) y expresadas previamente en bacterias. Estas proteínas recombinantes se unieron a glutatión sefarosa (GE Healthcare) y posteriormente se añadieron al extracto de HeLa, al que se tuvo en agitación durante 4 horas. Después se recupero la resina de sefarosa con las proteínas recombinantes y el resto de proteínas del extracto.

Fraccionamiento de cromatina

Para el fraccionamiento de cromatina se siguió el protocolo descrito en (Mendez and Stillman 2000)(Fig. 6). Las células se resuspendieron en buffer A (10mM Hepes pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.34M sacarosa y 10% de glicerol) con 1mM DTT e inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Se añadió 0.1% tritón X-100 y se incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugó a baja velocidad para separar los núcleos de la fracción citoplasmática. La fracción que contiene los núcleos se trató con buffer B (3mM EDTA y 0.2mM EGTA) con 1mM DTT y más inhibidores de proteasas durante 30 minutos en hielo. Se centrifugó de nuevo para separar la fracción que contiene el nucleoplasma y la fracción que contiene proteínas unidas a cromatina.

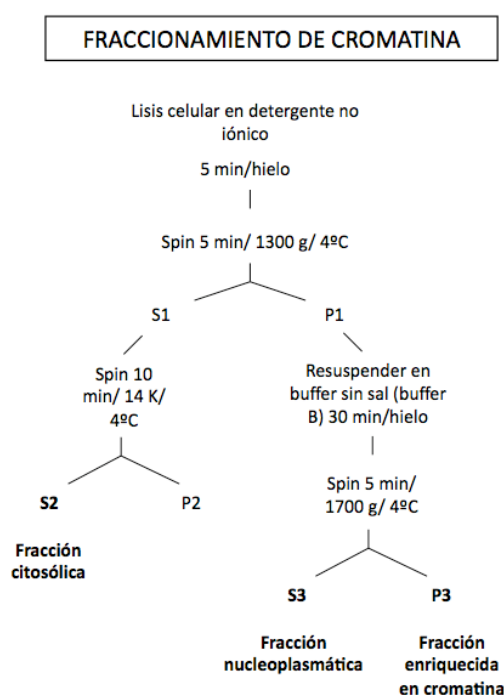


Figura 6: Esquema del protocolo seguido en el fraccionamiento de cromatina. Las fracciones usadas en los experimentos son la S2 (fracción citosólica), S3 (fracción nucleoplasmática) y P3 (fracción enriquecida en cromatina)

Ensamblaje de cromosomas de *Xenopus laevis*

Núcleos de espermatozoides de *X. laevis* (a una concentración de 800 a 1000 núcleos/ μ L) fueron incubados a 22°C durante 2 horas con extracto de huevos de *X. laevis* fresco a baja velocidad (LSS *Low-Speed Supernatants*, donde se eliminó el arresto en mitosis mediante la adición de Ca^{2+} obtenidos como se describe en (Losada et al. 1998)). Los extractos se llevaron a mitosis mediante la adición de un volumen igual de extracto arrestado con CSF (*Cytostatic factor*) e incubados a 22°C durante 2 horas. Para el análisis por inmunofluorescencia los extractos fueron fijados con 10 volúmenes de 2% paraformaldehído, 0,5% de tritón X-100 en XBE2 durante 10 minutos, y centrifugados en cubreobjetos. Posteriormente se incubó con anticuerpo 1º y 2º y finalmente se tiñó con DAPI.

Preparación de extractos mitóticos a partir de huevos de *Xenopus laevis*

Los extractos se preparan a partir de huevos recolectados tras una noche de ovulación. Las hembras de rana se preparan para la ovulación tras sucesivas inyecciones con gonadotropina de suero de yegua (PMSG) y posteriormente se induce su ovulación con gonadotropina coriónica humana (HCG).

Una vez que se recogen los huevos, se procede a la preparación de los extractos. En primer lugar se realizan varios lavados con tampón MMR (100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl_2 , 2mM CaCl_2 , 0.1mM EDTA, 5mM HEPES, pH7.8) y se elimina la cubierta gelatinosa que los envuelve con una solución de cisteína que empaqueta los huevos. A continuación se lavan con tampón XBE2 (100mM KCl, 0.1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM K-HEPES pH7.7, 5mM EGTA, 50mM sacarosa), eliminando los huevos con mal aspecto, como aquellos no uniformes o lisados. Se centrifugan para empaquetarlos a 500g 60 segundos, se elimina el exceso de tampón y se fracciona el contenido de los huevos por centrifugación a 10000 rpm, 15 minutos. Tras este paso se descarta la fracción de lípidos, membranas y pigmentos, y se recoge exclusivamente la fracción citoplasmática, que constituye los denominados “extractos de baja velocidad”. Estos extractos provienen de huevos parados en metafase II por acción del factor CSF, por eso son considerados como extractos mitóticos. Estos extractos pueden convertirse en interfásicos, añadiendo 0.4 mM calcio y 100 mg/ml cicloheximida (Sigma) que inhibe la síntesis de ciclina B, tras una incubación de 30 minutos a 22°C. Tanto los extractos mitóticos como interfásicos pueden ser sometidos a una centrifugación adicional durante 2 horas a 50000 rpm que elimina los restos de lípidos, membranas y ribosomas, obteniendo así los denominados “extractos de alta velocidad” (HSS). Estos últimos no son capaces de llevar a

cabo replicación del ADN. A partir de estos extractos HSS es de donde inmunoprecipitamos tanto INCEP como Aurora B para hacer nuestros ensayos quinasas.

Ensayo quinasas

Se inmunoprecipitó el *Chromosome Passenger Complex* (CPC) desde extractos mitóticos de *Xenopus laevis* usando un anticuerpo contra INCEP o Aurora B acoplado a unas bolas de agarosa magnéticas (Dynabeads, de Invitrogen) con proteína A. Las Dynabeads se lavaron con TBS-0,002% NP40, y se incubaron 15 min con 1mg/mL BSA en TBS-0.002% NP40. Se volvieron a lavar con TBS-0.002% y después con 0,1M Na-fosfato pH 8-0.002% NP40. Se incubaron 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos. Después de esto se volvieron a lavar con 0.1M Na-fosfato pH 8-0.002% NP40 y con XBE2. Las Dynabeads se mezclaron con extracto mitótico (con 80mM de β -glicerofosfato) y se incubaron de 1 a 2 h. Posteriormente las Dynabeads se lavaron con XBE2-0.002% NP40-80mM β -glicerofosfato, con XBE2-0.2% NP40- 80mM β -glicerofosfato y nuevamente con XBE2-0.002% NP40-80mM β -glicerofosfato. Para el ensayo quinasas propiamente dicho se usaron proteínas recombinante de HP1 expresadas en *E. Coli*, que se incubaron con las Dynabeads y 5 μ Ci de γ -32-P-ATP.

Ensayo fosfatasa

Los extractos mitóticos se incubaron durante 19 horas con colcemida para sincronizar las células en mitosis. Tras lisar las células en buffer RIPA, se cuantifico la cantidad de proteína y se digirieron 50 μ g de extracto con 0.625 U de fosfatasa lambda. Para comprobar la actividad de la fosfatasa, 50 μ g de extracto se incubaron previamente con 0.05M de EDTA (inhibidor de la fosfatasa), a continuación se continuó con el tratamiento con fosfatasa.

Tratamiento con bisulfito sódico

A las células tratadas con 1 μ M AZA se les extrajo el ADN con un buffer que contenía: Tris pH 8.8, 50mM, EDTA pH 8 10mM, NaCl 100mM, SDS 1% y proteinasa K 50 μ g/mL. Y se precipitó con NaCl 5M e isopropanol. El tratamiento con bisulfito propiamente dicho, se hizo usando 1 μ g de ADN en 50 μ L de agua, al que se añadió 5.7 μ L de NaOH 3M (para desnaturalizar el ADN y hacerlo sensible al tratamiento con bisulfito sódico). Se incubó 10-15 minutos a 37°C. Y finalmente se añadió 33 μ L de hidroquinona (Sigma) 20mM y 530 μ L de bisulfito sódico

MATERIALES Y MÉTODOS

(Sigma) 4.3M pH 5. Se mezcló y se incubó 16-17 horas a 50°C sin luz. Se purificó el ADN usando el kit ADN Clean-Up de Promega. La precipitación se hizo con NaOH 0.34M, acetato de amonio 2M, 1µL de glucógeno (Invitrogen) y etanol 90%. El ADN precipitado se resuspendió en 30 µL de agua, a partir del cual se hizo una PCR usando primers específicos contra la repetición del Satellite 2 (ATGGAAATGAAAGGGGTATTATT y AAATTATTCCATTCCATTCCATTAA). El producto de PCR se clonó usando el sistema del pGEM-T-EASY vector de Promega. Y finalmente se secuenció.

Clonaje y vectores usados en este estudio

HP1 α , β y γ recombinante fueron clonados en pGEX-2TK (la proteína GST se localizaba en el N-terminal de cada isoforma de HP1) fueron cortesía de P. Chambon (Institut de Genetique et Biologie Moleculaire et Cellulaire)(Nielsen et al. 2001). HP1 γ WT (*wild-type*), S93A y S93E recombinante fueron clonados en pDEST15 (Invitrogen, también la proteína GST se situó en el extremo N-termina de HP1).

Purificación de proteínas recombinantes unidas a GST

En bacterias BL21 con el plásmido que contenía la proteína recombinante fusionada a GST se crecieron hasta una densidad de 0.6-0.8 (densidad óptica a 600 nm) en un volumen de 500 mL. En ese momento se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante IPTG y se estuvieron creciendo durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se resuspendió el pellet de bacterias en 25 mL PBS frío y se congeló (en nitrógeno líquido) y se descongeló (en agua) de 2 a 3 veces. Se añadió lisozima a 1 mg/mL y se incubó durante 30 minutos. A continuación se añadió 1 mM de PMSF, 1 mM DTT y 1:5000 de LPC (inhibidores de proteasas). Tras esto se sonicó en hielo 6 veces al 20% de amplitud durante 10 segundos con pausas de 20 segundos tras cada sonicación. Se añadió 1% tritón X-100 y se estuvo rotando 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante. Al sobrenadante se le echó 1,5 mL de glutathion *beads* y se tuvieron rotando con el lisado 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugó para recuperar las *beads* a 500 g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron 10 veces con PBS frío. Para eluir la proteína se añadió 1.5 mL de buffer de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM glutathion reducido).

Anticuerpos primarios**Anticuerpos contra Cohesina o Condensina:**

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
Scc1	Conejo	2 µg/mL	-	-	(Losada et al. 1998)
Smc1	Conejo	-	-	2 µg/mL	Losada A. Lab.
Smc2	Conejo	2 µg/mL	2 µg/mL	-	(Losada et al. 2000)
Smc3	Conejo	-	-	2 µg/mL	(Losada et al. 1998)

Anticuerpos contra *Shugoshin*:

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
Sgo1	Conejo	2 µg/mL	2 µg/mL	-	Losada A. Lab.
Sgo2	Conejo	-	2 µg/mL	-	Losada A. Lab.

Anticuerpos contra *Chromosome Passenger Complex*:

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
Aurora A	Ratón	1 µg/mL	1:2000	-	Abcam (13824)
Aurora B	Ratón	-	1:500	-	BD Transduction Lab.
Aurora B	Conejo	1:1000	1:1000	-	Abcam (2254)
Aurora B	Conejo	-	-	2,5 µg/IP	(MacCallum et al. 2002)
INCEP	Conejo	-	2 µg/mL	5 µg/IP	(MacCallum et al. 2002)

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos contra HP1:

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
HP1 α	Ratón	1:1000	1:250	10 μ g/IP	Upstate
HP1 α	Conejo	2 μ g/mL	-	-	Losada A. Lab
HP1 β	Ratón	1:1000	1:250	10 μ g/IP	Eurogentec
HP1 γ	Ratón	1:75000	1:500	10 μ g/IP	Millipore
HP1 γ -S93P	Conejo	1:1000	1:200	-	Abcam

Anticuerpos contra histonas:

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
H4K8Ac	Conejo	-	1:50	-	Upstate
H4	Conejo	1:30000	-	-	Upstate
H3S10P	Conejo	-	1:10000	-	(MacCallum et al. 2002)
H3S10P	Ratón	-	1 μ g/mL	-	Abcam (14955)

Anticuerpos contra tags:

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
GST	Ratón	1:1000	-	-	CNIO
MYC	Ratón	-	No diluido	-	CNIO

Otros Anticuerpos:

Anticuerpo	Origen	[] WB	[] IF	[] IP	Referencia
α -tubulina	Ratón	1:5000	1:500	-	Sigma
Suv39h1	Ratón	1:250	-	-	Upstate
Ciclina B	Ratón	1:100	-	-	Santa Cruz
ORC2	Conejo	1:2000	-	-	(Mendez & Stillman 2000)
MEK2	Ratón	1:1000	-	-	BD Transduction Lab.
CENP-E	Ratón	-	2 μ g/mL	-	Abcam
CREST	Humano	-	1:50	-	Suero de pacientes
ISWI	Conejo	1:1000	-	-	(MacCallum et al. 2002)

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estudio de la función de HP1 en la regulación de la Cohesina

1.1 Localización de las proteínas HP1 en células HeLa a lo largo del ciclo celular

1.1.1 Estudio de la localización de las proteínas HP1 mediante inmunofluorescencia

Puesto que habíamos decidido llevar a cabo el estudio de la función de las proteínas HP1 en la regulación de la segregación cromosómica en células HeLa, el primer paso fue caracterizar su localización en esta línea celular. Para ello se hicieron tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen específicamente las tres isoformas de HP1: HP1 α , HP1 β y HP1 γ . Observamos que durante interfase estas proteínas se localizan dentro del núcleo y forman focos (Fig. 7A, fila superior). Estos focos son más claros al tratar las células con detergente antes de fijarlas (denominado preextracción). Dicho tratamiento elimina preferentemente la fracción de proteína soluble en el nucleoplasma, y afecta en menor medida a la fracción unida a cromatina (Fig. 7A, segunda fila). Los focos corresponden a dominios de heterocromatina pericentromérica y son mucho más notorios en células de ratón que en células humanas (Maison and Almouzni 2004; Minc et al. 1999; Nielsen et al. 2001). De todos modos, en células que se encuentran en la fase G2 del ciclo, cuando el CPC (*Chromosome Passenger Complex*) comienza a acumularse en las regiones pericentroméricas, podemos observar una co-localización clara de una de sus subunidades, INCENP (*Inner Centromere Protein*), con las tres proteínas HP1 (ver Fig. 18).

Cuando las células entran en mitosis, la mayor parte de las proteínas HP1 se disocian de la cromatina. Como se menciona en la Introducción, esta disociación es consecuencia de la fosforilación de la Ser10 de la histona H3 por la quinasa del CPC, Aurora B, que desestabiliza la unión de HP1 a la Lisina 9 metilada (Fischle et al. 2005; Hirota et al. 2005). Así, en preparaciones de células fijadas sin preextracción, la tinción que se obtiene por toda la célula (una vez rota la membrana nuclear) parece excluir los cromosomas condensados (Fig. 7A, tercera fila). Sin embargo, en células sometidas a extracción con detergente antes de la fijación, se observa que una pequeña fracción de HP1 permanece unida a la cromatina mitótica, al menos en el caso de HP1 α y HP1 γ (Fig. 7A, última fila). Para estudiar con más detalle la localización de las proteínas en mitosis repetimos la tinción por inmunofluorescencia sobre preparaciones de cromosomas mitóticos arrestados en metafase (*metaphase chromosome spreads*) obtenidas mediante centrifugación (o citospín). Como puede apreciarse en la Fig. 7B, tanto HP1 α como HP1 γ se acumulan preferentemente en la región centromérica,

donde colocalizan con Aurora B. De nuevo fallamos en poder observar la presencia de HP1 β en el cromosoma. La presencia de HP1 α y HP1 γ y la falta de HP1 β en el centrómero están acordes con otras publicaciones (Minc et al. 1999; Koch et al. 2008). Esta observación nos pueden estar indicando un papel primordial de HP1 α y HP1 γ en mitosis que no tiene HP1 β : en concreto algunos autores han identificado la interacción entre HP1 α y HP1 γ con Mis12 (Obuse et al. 2004), una proteína esencial para la formación del cinetocoro (Vos et al. 2006). En esta misma publicación (Obuse et al. 2004) no se menciona ninguna interacción con HP1 β .

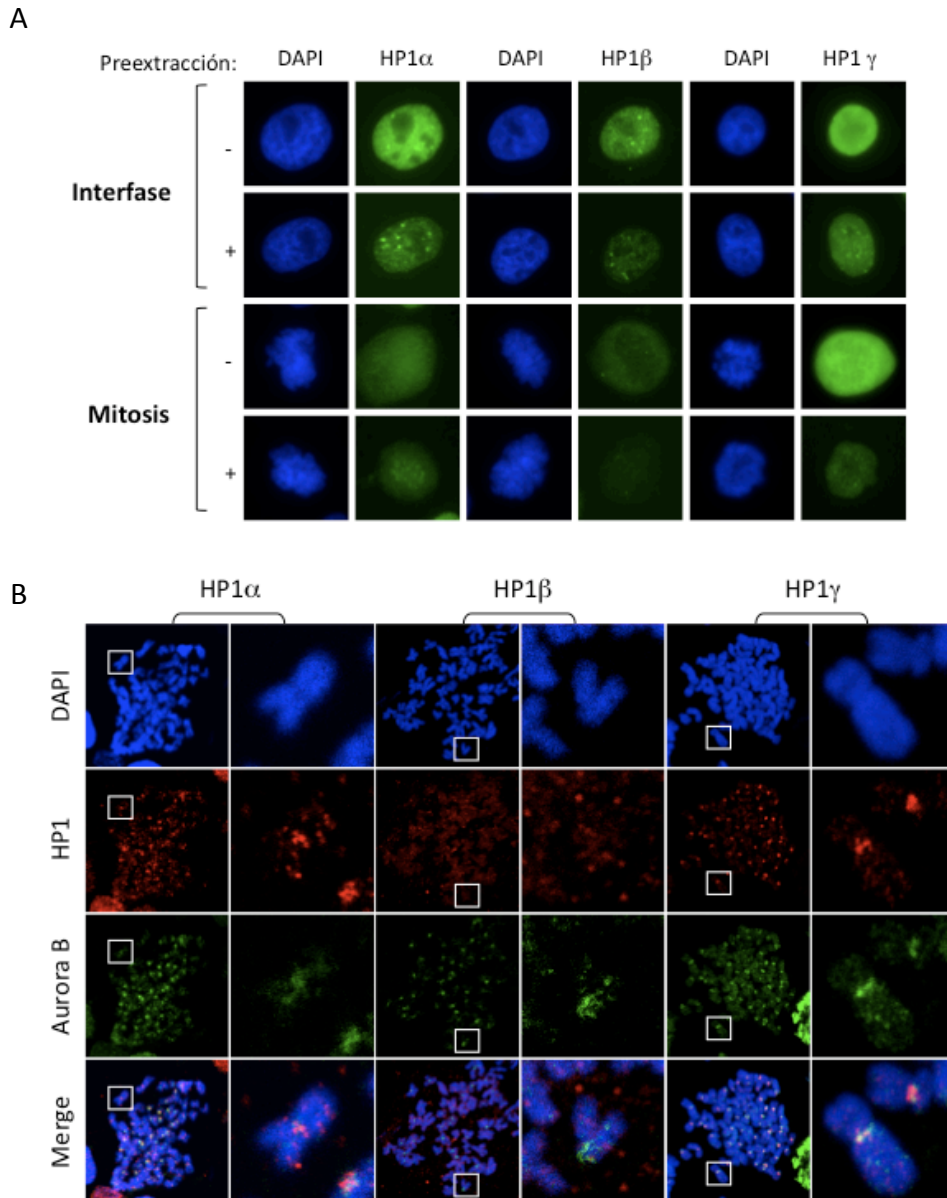


Figura 7. Localización de HP1 durante el ciclo celular. (A) Microscopía de fluorescencia de cada una de las isoformas de HP1 (verde) durante interfase y mitosis, con o sin preextracción (tratamiento con o sin detergente). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(B)** Microscopía confocal de extensiones de cromosomas obtenidas mediante citospín. La quinasa mitótica Aurora B (en verde) localiza en el centrómero, cada una de las isoformas de HP1 (α , β o γ) aparecen en rojo. Las células fueron teñidas con DAPI (azul).

1.1.2 Estudio de la localización de las proteínas HP1 mediante fraccionamiento bioquímico

Para estudiar en mayor profundidad la regulación de HP1 durante el ciclo celular llevamos a cabo un fraccionamiento bioquímico (o fraccionamiento de cromatina) de una población sincrónica de células (Méndez and Stillman 2000) (Fig. 8). Mediante este procedimiento el contenido de la célula se separa en tres fracciones: una fracción citoplasmática (S2), una fracción nucleoplasmática (S3) y una fracción enriquecida en proteínas unidas a cromatina (P3). Se obtuvieron poblaciones de células sincrónicas mediante un doble bloqueo con timidina, que permite parar el ciclo al comienzo de la fase S, y posteriormente se tomaron muestras a distintos tiempos tras eliminar la timidina del medio de cultivo y así obtener poblaciones enriquecidas en G1/S, S y M (para más detalle ver Materiales y métodos). El análisis de una parte de estas muestras por citometría de flujo revela el momento del ciclo celular en que se encuentran (Fig. 8, arriba). El análisis por *western blot* de las distintas fracciones con anticuerpos contra las proteínas HP1 se presenta en la parte inferior de la Figura 8. Como control del método de fraccionamiento se usaron anticuerpos que reconocen MEK2, una quinasa citoplasmática que sólo debería estar presente en la fracción S2, y ORC2, un componente de los complejos pre-replicativos que aparece unido a la cromatina (P3) a lo largo de todo el ciclo celular.

En el caso de HP1 α , se observa que la mayor parte de la proteína está presente en la fracción de cromatina durante G1/S y S (carriles 4, 8), y sólo se detecta una pequeña cantidad en la fracción nucleoplasmática (carriles 3, 7). Estos resultados bioquímicos coinciden con los obtenidos mediante inmunofluorescencia. En el caso de HP1 β y HP1 γ , sin embargo, una cantidad apreciable de ambas proteínas aparece en la fracción citoplasmática (carriles 2, 6). El primer paso del fraccionamiento bioquímico empleado requiere un tratamiento corto con detergente que desestabiliza la membrana plasmática y que puede afectar parcialmente a la membrana nuclear. En esta última instancia, no es raro que parte de las proteínas presentes en el nucleoplasma aparezcan en la fracción S2. Por otro lado, estudios de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) en células CHO que expresan GFP-HP1 han demostrado que la unión de HP1 a la cromatina es muy dinámica (Cheutin et al. 2003). Así, durante interfase, el 50-80% de las moléculas de HP1 presentan una movilidad alta, siendo HP1 α la isoforma con un mayor tiempo de residencia en la heterocromatina pericentromérica (Schmiedeberg et al. 2004). Esta diferencia de movilidad es seguramente el resultado de una unión a la cromatina más lábil en el caso de HP1 β y HP1 γ . Es por tanto posible que estas dos isoformas sean más fáciles de extraer de la cromatina y por ello aparecen en mayor proporción no sólo en la fracción S3 (nucleoplasmática) sino también, por las razones antes mencionadas, en la fracción

S2 (citoplasmática). Por otro lado no se observan diferencias notables en la distribución de las proteínas HP1 entre las fases G1/S y S, mientras que en mitosis la mayoría de las tres isoformas HP1 desaparece de las fracciones S3 y P3 (carriles 11 y 12). Esta disminución corresponde con la disociación de cromatina que se observa mediante inmunofluorescencia (Fig.7). Hay que recordar que la membrana nuclear desaparece durante mitosis y por tanto toda la proteína no unida a cromatina aparece en la fracción S2 (carril 10).

A través de estos experimentos podemos también observar como las HP1s son degradadas o sintetizadas a lo largo del ciclo celular. Así tanto por inmunofluorescencia (si nos fijamos en células no preextraídas, Fig. 7) como por *western blot* (si nos fijamos en los carriles donde está el extracto total carriles 1, 5 y 9, Fig. 8), podemos ver que tanto HP1 α como HP1 β son parcialmente degradadas al llegar a mitosis, mientras que HP1 γ permanece intacta durante todo el ciclo. Esta degradación dependiente de ciclo es la primera vez que se observa y desconocemos cual es su función.

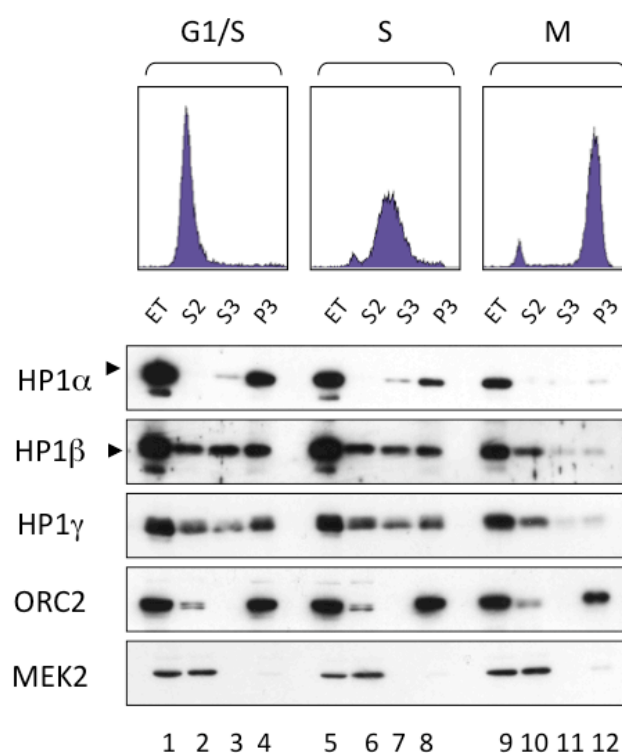


Figura 8. Distribución de HP1 durante el ciclo celular: Fraccionamiento de cromatina en células sincronizadas en diferentes estadios del ciclo celular: G1/S (carriles 1-4), S (carriles 5-8) y M (carriles 9-12). Para más detalle de cómo se sincronizaron las células consultar el capítulo de Materiales y métodos, apartado Cultivo de células y tratamiento con drogas. Como control del fraccionamiento se utilizó la proteína MEK2 (fracción citosólica) y ORC2 (fracción enriquecida en cromatina). ET: extracto total, S2: fracción citosólica, S3: fracción nucleoplasmática y P3: fracción enriquecida en cromatina.

1.2 HP1 no interacciona con Cohesina pero en cambio si lo hace con Sgo1

Como se menciona en la Introducción, resultados obtenidos en *S. pombe* sugieren la existencia de una interacción física entre Swi6/HP1 y Cohesina que presumiblemente dirige la acumulación de Cohesina en la heterocromatina centromérica de esta levadura (Nonaka et al. 2002). Con el fin de estudiar si un mecanismo similar opera en células humanas, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación a partir de extractos nucleares de células HeLa con anticuerpos que reconocen la subunidad Smc3 de la Cohesina y las tres isoformas de HP1 (Fig. 9A). En todos los casos se detectó en la fracción inmunoprecipitada la proteína que reconoce el anticuerpo usado. Además, en el caso de los inmunoprecipitados obtenidos con anti-HP1 β y anti-HP1 γ se obtuvo una pequeña fracción de las otras dos isoformas de HP1, resultado que refuerza la idea de que estas proteínas interaccionan entre sí (Nielsen et al. 2001). También se observa coimmunoprecipitación de la histona-metil-transferasa Suv39h1 (Aagaard et al. 1999). Sin embargo, no detectamos en ningún caso a la Cohesina Smc3 (carriles 5, 6 y 7 Fig. 9A). Igualmente, al inmunoprecipitar Smc3 tampoco aparece ninguna isoforma de HP1 (carril 3 de Fig. 9A)

Muchas de las interacciones que tienen lugar en la célula son de naturaleza lábil, lo que dificulta su detección en las condiciones de una inmunoprecipitación convencional. Por tanto, decidimos repetir las reacciones de inmunoprecipitación en un extracto al que previamente añadimos formaldehído, un agente entrecruzante que estabiliza las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN. El extracto se separó en fracción soluble y fracción unida a cromatina (ver Materiales y métodos). En esta condición, en los inmunoprecipitados de HP1 γ obtenidos de ambas fracciones se detectó, además de esta isoforma, una pequeña cantidad de HP1 α pero en ningún caso se observó una interacción específica con Cohesina (Fig. 9B, carriles 4 y 8) .

A continuación decidimos probar la técnica del *pull-down* (Fig. 9C). Para ello se incubaron extractos nucleares de células HeLa (sin tratar con formaldehído) con cantidades equivalentes de proteína recombinante GST-HP1 α , β o γ , o GST como control, inmovilizadas en un soporte de agarosa. Tras eliminar el extracto y lavar cuidadosamente la fracción unida a la matriz de agarosa, se analizó el contenido de la misma mediante *western blot*. Tampoco en este caso se observó una interacción específica entre las proteínas HP1 y Cohesina (carriles 3, 4 y 5). Sin embargo, sí se detectó interacción con Sgo1, recientemente descrita (Yamagishi et al. 2008) y que sirve de control positivo del ensayo.

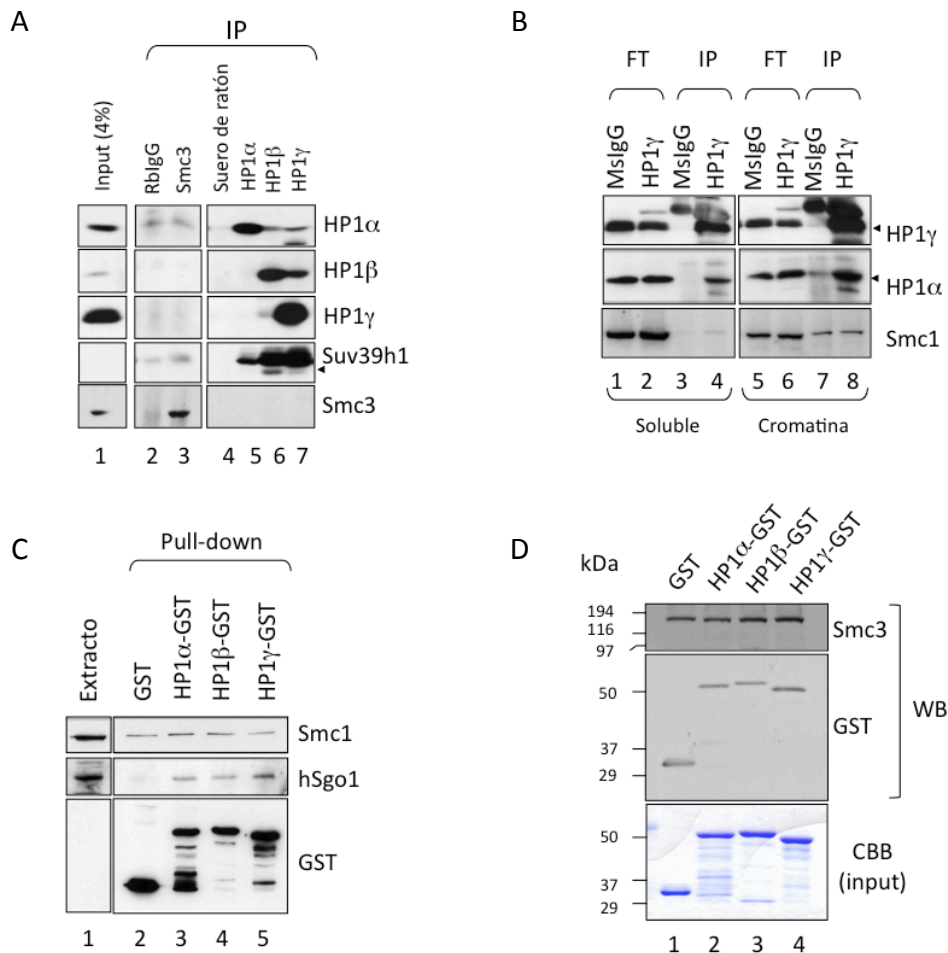


Figura 9. Búsqueda de la interacción entre las proteínas HP1 y Cohesina. (A) Inmunoprecipitación de Cohesina (carril 3) y las tres isoformas de HP1 (carriles 5-7) a partir de extractos nucleares de células HeLa. Los controles correspondientes se hicieron de idéntica forma con IgG preinmunes de conejo (carril 2) o suero preinmune de ratón (carril 4). Una alícuota del extracto utilizado se analizó en paralelo (carril 1). **(B)** Inmunoprecipitación de HP1γ (carriles 2, 4, 6 y 8) de extractos previamente tratados con formaldehído y separados en una fracción proteica soluble (carriles 1-4) y enriquecida en cromatina (carriles 5-8). En las reacciones “control” se usaron IgG preinmunes de ratón (carriles 1, 3, 5 y 7). Se analizaron los inmunoprecipitados (IP) y una alícuota de los extractos tras separación de los complejos antígeno-anticuerpo (*Flow-Through*, FT). **(C)** Extractos nucleares de células HeLa (carril 1) se incubaron con una fracción de proteína recombinante unida a una matriz de agarosa: GST (carril 2), HP1α-GST (carril 3), HP1β-GST (carril 4) o HP1γ-GST (carril 5), y la presencia de Cohesina en esta matriz se analizó posteriormente por *western blot*. **(D)** Una fracción de Smc3 inmunoprecipitada de extractos nucleares de células HeLa en una matriz de agarosa-proteína A se incubó con una solución de proteína recombinante: GST (carril 1), HP1α-GST (carril 2), HP1β-GST (carril 3) y HP1γ-GST (carril 4). Posteriormente se recuperó la matriz de agarosa y la presencia de HP1 se analizó mediante *western blot* con anti-GST. La interacción entre el complejo Smc3-anticuerpo-*beads* y HP1-GST se analizó por *western blot*. El geles de la parte inferior, teñido con Coomassie (CBB), muestra que la concentración de todas las proteínas recombinantes era similar.

Como último intento para detectar una interacción entre las proteínas HP1 y Cohesina, se inmunoprecipitó esta última de extractos nucleares de HeLa con anticuerpos anti-Smc3 unidos a una matriz de agarosa-proteína A. A continuación, esta fracción se incubó con las

proteínas recombinantes GST-HP1 α , β o γ , o GST como control, en solución. El análisis de la fracción unida a la matriz de agarosa reveló que contenía Smc3, como era de esperar, y una pequeña cantidad de las proteínas recombinantes (Fig. 9D). Sin embargo, esta interacción es inespecífica, puesto que también se observa con la proteína GST. En resumen, no hemos encontrado evidencias experimentales que demuestren la existencia de una interacción física entre las proteínas HP1 y la Cohesina en células humanas. Por otro lado la ausencia de interacción entre HP1 α y Cohesina ya ha sido descrita por otros autores (Koch et al. 2008).

1.3 Reducción de los niveles de HP1 mediante ARNi

1.3.1. El tratamiento con siRNA reduce significativamente los niveles de HP1 en la célula

Para estudiar el posible papel de las proteínas HP1 en la regulación de la cohesión, decidimos llevar a cabo experimentos de ARN interferente (ARNi) que nos permitieran reducir los niveles de estas proteínas en las células HeLa. Se diseñaron oligos de siRNA (*small interference RNA*) contra cada una de las isoformas de HP1, se transfectaron en cultivos de células asincrónicas, y se analizaron los niveles de las proteínas HP1 para determinar la efectividad del tratamiento. Al comparar mediante *western blot* la cantidad de cada HP1 en células transfectadas con un siRNA específico y con una mezcla sin siRNA como control, se observó que en los tres casos se reducían los niveles de la proteína correspondiente en más del 90% (Fig. 10A). El protocolo utilizado conlleva dos transfecciones consecutivas, separadas por un período de 24 horas. La reducción de HP1 se detecta tres días después de la primera transfección, y se mantiene sin cambios significativos transcurridas otras 48 horas (5 días). Además, la reducción se confirmó mediante tinción de inmunofluorescencia (con preextracción) de las distintas poblaciones celulares (Fig. 10B). En este caso solo se presentan los datos tras 5 días después de la primera transfección.

Como está descrito que las proteínas HP1 interaccionan entre sí formando homodímeros y heterodímeros (Nielsen et al. 2001), nos preguntamos si la eliminación individual de alguna de las isoformas conducía a una reducción en los niveles de las otras isoformas en cromatina por desestabilización de los dímeros. Como puede verse en la Fig. 10B este no parece ser el caso, sino que se observa más bien el efecto contrario: cuando se reducen los niveles en el caso de HP1 γ aumenta la cantidad de HP1 α y HP1 β unidas a cromatina (Fig. 11A). En cambio, la eliminación de HP1 α o HP1 β no conlleva un aumento apreciable de los niveles en cromatina de las otras dos isoformas (Fig. 10B y 11A).

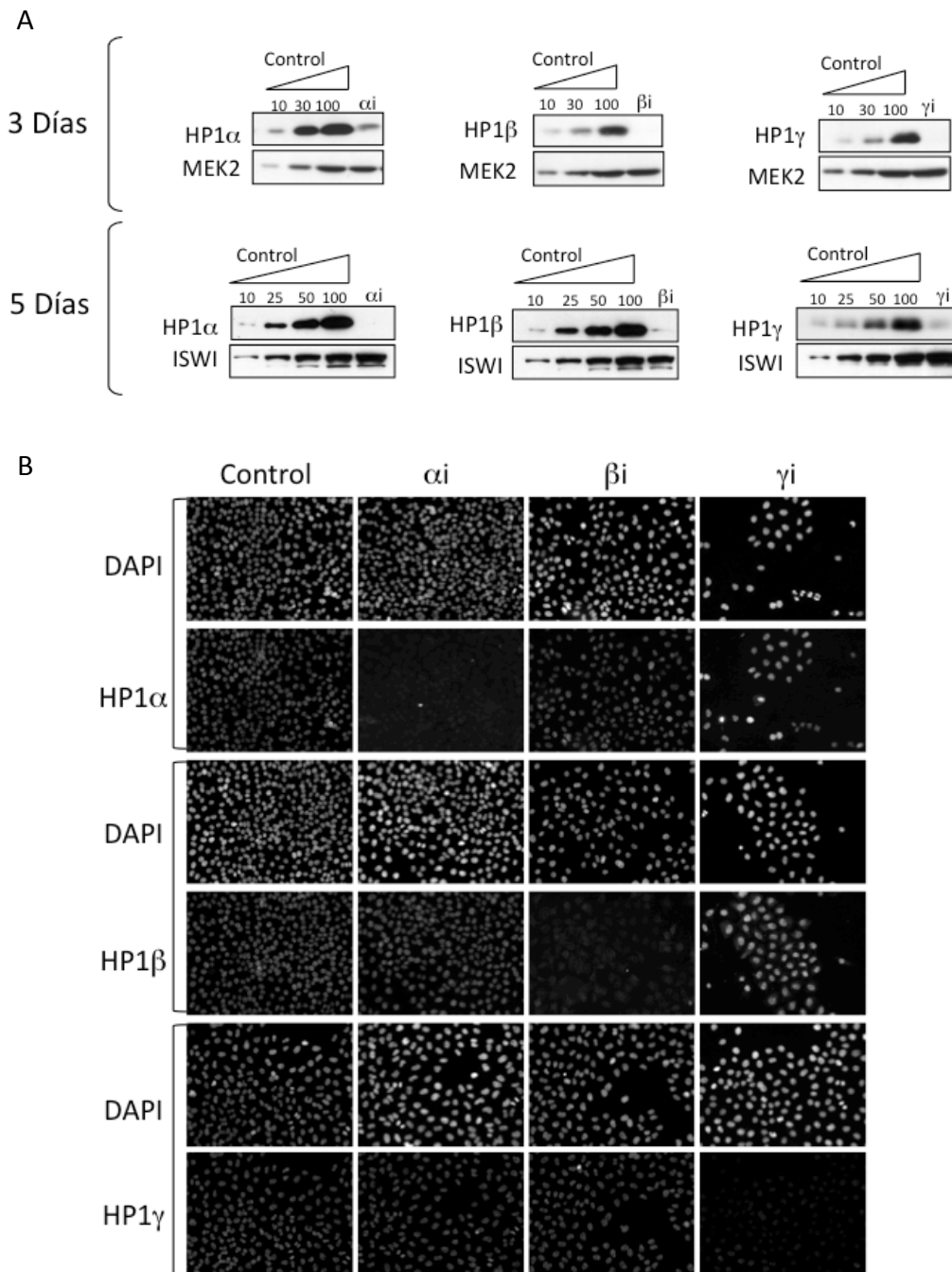


Figura 10. Eliminación mediante siRNA de cada una de las isoformas de HP1. (A) Análisis por *western blot* de los niveles de las proteínas HP1 en poblaciones asincrónicas de células HeLa transfectadas con siRNA específicos para HP1 α (α i), HP1 β (β i) o HP1 γ (γ i), tres o cinco días después de la primera transfección (ver Materiales y métodos). Para poder determinar de forma cuantitativa los niveles de proteína se cargaron en cada gel cantidades crecientes de un extracto total de células control (10-30-100% o 10-25-50-100% y la cantidad equivalente al 100% del extracto de células tratadas con el siRNA correspondiente). MEK2 y ISWI se usaron como control de carga. **(B)** Análisis por inmunofluorescencia de las mismas poblaciones celulares con los anticuerpos indicados tras el tratamiento con detergente antes de las fijación (preextracción). El análisis se llevó a cabo 5 días después de la primera transfección. El ADN se tiñó con DAPI.

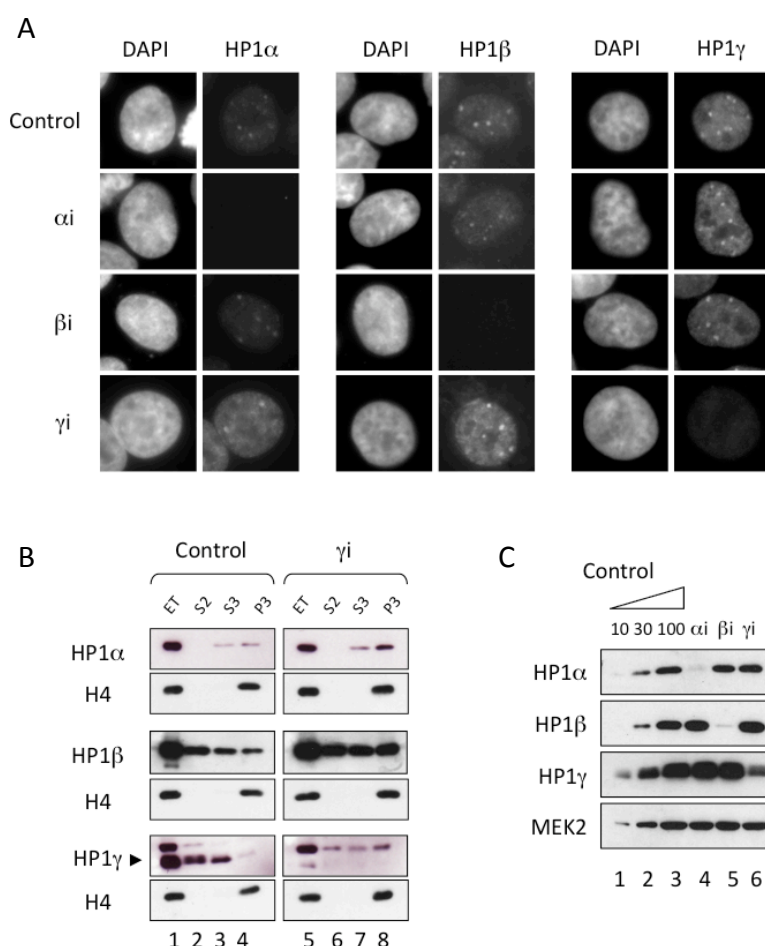


Figura 11. La eliminación de HP1γ incrementa la cantidad de HP1α o β en la cromatina. (A) Microscopía de fluorescencia de células tratadas con el siRNA contra cada una de las isoformas de HP1 (HP1α (αi), HP1β (βi) o HP1γ (γi)), tras cinco días después de la primera transfección (ver Materiales y métodos) y preextraídas para dejar únicamente la fracción de HP1 unida a cromatina. Las células se trataron con los anticuerpos indicados y se tiñeron con DAPI. **(B)** Fraccionamiento de cromatina en células tratadas con el siRNA contra HP1γ (γi). La histona H4 se usó para indicar la fracción unida cromatina. Carriles del 1-4: Control. Carriles del 5-8: Muestras tratadas con el siRNA contra HP1γ. ET: extracto total, S2: fracción citosólica, S3: fracción nucleoplasmática y P3: fracción enriquecida en cromatina. **(C)** Análisis por *western blot* de los niveles de las proteínas HP1 en poblaciones asincrónicas de células HeLa transfectadas con siRNA específicos para HP1α (αi), HP1β (βi) o HP1γ (γi). Para poder determinar de forma cuantitativa los niveles de proteína se cargaron en cada gel cantidades crecientes de un extracto total de células control (10-30-100%) y la cantidad equivalente al 100% del extracto de células tratadas con el siRNA correspondiente.

El análisis de la distribución y cantidad de las tres isoformas de HP1 en células control y células tratadas con el siRNA de HP1γ mediante el fraccionamiento bioquímico descrito en un apartado anterior corrobora el aumento de la cantidad de HP1α o HP1β en la fracción unida a cromatina (P3) tras la eliminación de HP1γ (Fig. 11B, carriles 4 y 8). No obstante una posibilidad es que HP1γ regule positivamente la expresión de los genes que codifican HP1α o HP1β, o que influya en su estabilidad, de manera que la eliminación de HP1γ tenga como resultado un aumento en los niveles totales de HP1α o HP1β y por tanto en cromatina. Sin

embargo, este no parece ser el caso como se ve en la figura 11C, donde se muestran los niveles totales de cada isoforma tras eliminar una de ellas (en concreto los niveles totales de HP1 α o HP1 β no parecen aumentar tras tratar con el siRNA de HP1 γ , carril 6). El aumento específico de la cantidad de estas isoformas unidas a cromatina nos podría estar indicando la importancia relativa de la isoforma de HP1 γ con respecto a las otras dos, cuantitativa y/o cualitativamente. Es posible que una mayoría de los dímeros HP1 sean heterodímeros de HP1 x -HP1 γ (donde x es α , β o γ) de forma que al eliminar HP1 γ se incremente considerablemente la cantidad de dímeros HP1 α -HP1 β , con su consiguiente reclutamiento a la cromatina.

1.3.2 El tratamiento con siRNA elimina la fracción de HP1 presente en los centrómeros

En el apartado anterior se muestra cómo el tratamiento de ARNi reduce drásticamente los niveles de las proteínas HP1 tanto en lo que se refiere a niveles totales como de la fracción unida a cromatina. En mitosis, sólo una pequeña cantidad de HP1 permanece unida a los cromosomas, y se localiza principalmente en la región pericentromérica. Es probable que esta población se una a la cromatina con una afinidad mayor, y por ello consideramos la posibilidad de que las moléculas de HP1 que permanecen en la célula tras el tratamiento de ARNi se concentren en esta región y sean capaces de llevar a cabo su posible función en la regulación de la cohesión. Sin embargo, la tinción de inmunofluorescencia de células mitóticas tratadas con detergente antes de la fijación indicó que la fracción de HP1 presente en los cromosomas es indetectable tras el tratamiento con el siRNA (tras 5 días después de la primera transfección, Fig. 12A). En preparaciones de cromosomas mitóticos (mediante citospín) también se observa con claridad la desaparición de la señal de HP1 α o HP1 γ de los centrómeros, marcados con suero CREST (Fig. 12B).

1.3.3 La reducción de los niveles de cada proteína HP1 por separado no altera la progresión del ciclo celular

Una vez que comprobamos que nuestros oligos reducían de forma eficiente cada una de las isoformas de HP1, estudiamos el efecto de dicha reducción sobre el ciclo celular. Sorprendentemente, aún cuando las proteínas HP1 se han implicado en múltiples procesos celulares, los perfiles de citometría de flujo de cultivos asincrónicos de células tratadas con siRNA no revelan un efecto apreciable sobre la progresión del ciclo celular (Fig. 13A). Solamente la eliminación de HP1 γ conduce a un incremento en el número de células

RESULTADOS

apoptóticas o sub G0 (10%) y principalmente tras 5 días desde la primera transfección (Fig.13B).

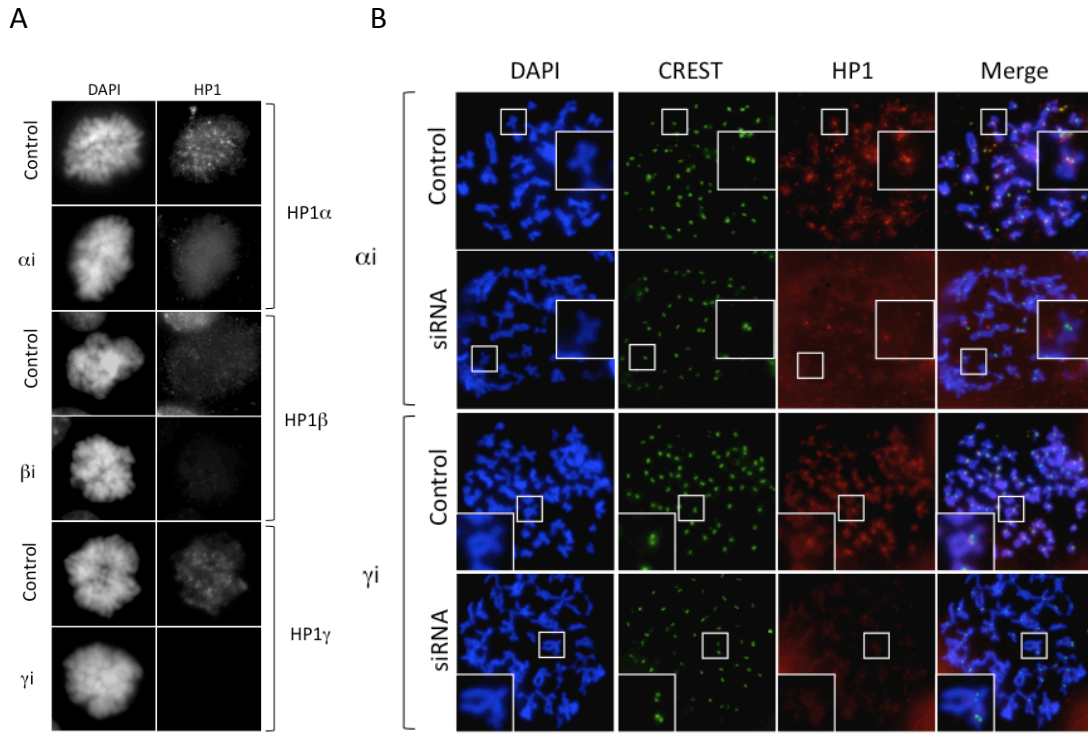


Figura 12. Eliminación de la población HP1 unida al cromosoma durante mitosis. (A) Microscopía de fluorescencia de mitosis preextraídas, tratadas con los anticuerpos indicados y teñidas con DAPI. Además en los casos indicados las células fueron tratadas con el siRNA contra la isoforma de HP1 correspondiente: HP1 α (α i), HP1 β (β i) o HP1 γ (γ i). **(B)** Microscopía de fluorescencia de extensiones de cromosomas obtenidas con citospín en células tratadas con el siRNA contra HP1 α (α i) o HP1 γ (γ i). Las células fueron tratadas con los anticuerpos correspondientes, contra HP1 α o HP1 γ (en rojo), CREST (para marcar los cinetocoros, en verde) y teñidas con DAPI (azul). Tanto en A como en B los niveles de las isoformas de HP1 fueron analizados 5 días después de la primera transfección.

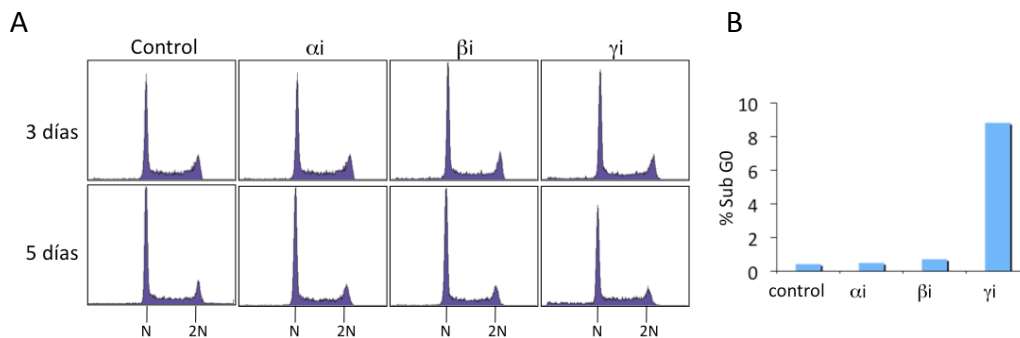


Figura 13. Efecto de la eliminación de HP1 sobre el ciclo celular. (A) Análisis del ciclo celular mediante ioduro de propidio en células HeLa tratadas con los siRNA contra cada una de las isoformas de HP1: HP1 α (α i), HP1 β (β i) o HP1 γ (γ i) tras 3 o 5 días después de la primera transfección. El eje X representa la cantidad de ADN de las células y el eje Y el número de eventos o células con esa cantidad de ADN. **(B)** Porcentaje de células subG0 tras la eliminación de cada HP1, después de 5 días de la primera transfección.

1.3.4 La eliminación de HP1 no afecta a la carga de Cohesina en cromatina

La Cohesina se carga en cromatina al principio de la fase G1 en células humanas y la mayoría permanece asociada hasta profase. Para comprobar si la reducción de los niveles de las proteínas HP1 afecta a la cantidad total de Cohesina unida a cromatina, se llevaron a cabo fraccionamientos celulares de cultivos asincrónicos tratados previamente con el correspondiente siRNA (Fig. 14A). La Cohesina se detecta fundamentalmente en la fracción de cromatina (P3, carriles 4, 8, 12 y 16) y solamente una pequeña cantidad aparece en la fracción citoplasmática (carriles 2, 6 10 y 14). Esta distribución no se altera de forma apreciable tras la eliminación de HP1 α , HP1 β o HP1 γ , lo que sugiere que ninguna de estas proteínas es esencial para la asociación de Cohesina a cromatina.

En el caso de *S. pombe*, Swi6/HP1 es sólo necesaria para el reclutamiento de Cohesina a la región de heterocromatina pericentromérica. Puesto que en células humanas la heterocromatina pericentromérica supone el 15-20% del genoma, una reducción de la cantidad de Cohesina en esta región podría ser difícil de detectar al analizar niveles totales de Cohesina unida a cromatina, como se describe en el experimento anterior. Para evaluar específicamente la población de Cohesina presente en la región pericentromérica recurrimos por tanto a tinciones de inmunofluorescencia de cromosomas mitóticos en los que podemos analizar la cantidad de Cohesina presente alrededor de la constricción primaria. Esta población de Cohesina mitótica es difícil (si no imposible) de detectar con los anticuerpos disponibles. En su lugar se utilizan anticuerpos anti-myc en una línea de células HeLa que expresa, de forma inducida, la subunidad Scc1 de la Cohesina fusionada a una cola de 9 repeticiones “myc” (Waizenegger et al. 2000).

Se repitieron por tanto los experimentos de ARNi de las proteínas HP1 en esta línea celular (Fig. 14B), y antes de recoger las células éstas se dejaron durante 16-20 horas en medio con colcemida para incrementar el porcentaje de células mitóticas. Las muestras se trataron con detergente antes de fijar para eliminar así la Cohesina soluble, que en células mitóticas es la mayoritaria, y se incubaron con anticuerpos anti-myc y suero CREST que marca el par cinetocórico de cada cromosoma. A continuación se contabilizaron las metafases de cada muestra en las que puede observarse la tinción de Cohesina en la región entre centrómeros hermanos. La eliminación por separado o conjuntamente de HP1 α o HP1 γ (Fig. 14C) como se recoge en la gráfica de la figura 14D no parece afectar de forma significativa a la presencia de Cohesina en la región centromérica.

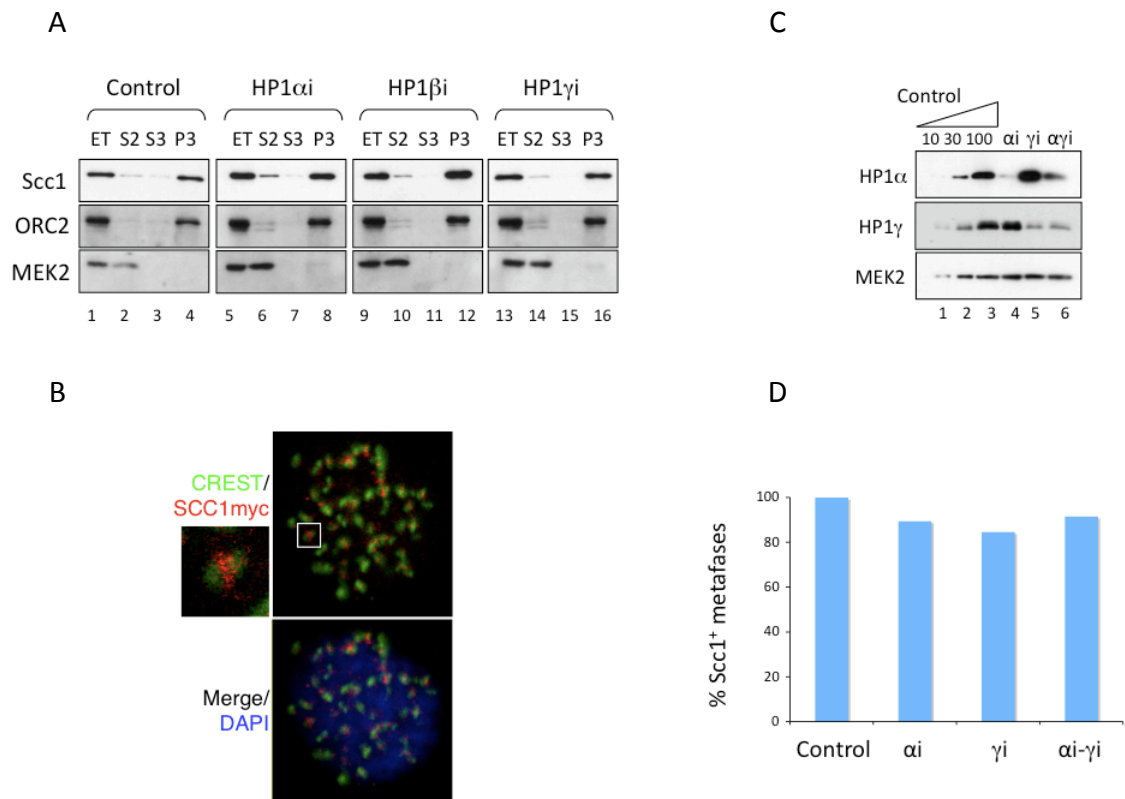


Figura 14. La eliminación de HP1 no afecta a la localización de Cohesina ni en el centrómero ni en los brazos de los cromosomas. (A) Fraccionamiento de cromatina de células tratadas con los siRNA de HP1 α (α i), HP1 β (β i) o HP1 γ (γ i). Las células fueron analizadas 5 días después de la primera transfección. Como controles del fraccionamiento se volvió a usar a MEK2 y a ORC2. Carriles del 1-4: Control. Carriles del 5-8: Células tratadas con el siRNA contra HP1 α . Carriles del 9-12: siRNA HP1 β . Carriles del 13-16: siRNA HP1 γ . ET: extracto total. S2: fracción citosólica. S3: fracción nucleoplasmática. P3: fracción enriquecida en cromatina. **(B)** Microscopía confocal de mitosis preextraídas en células expresando la construcción Scc1-Myc (rojo). También se marcaron con DAPI (azul) y CREST (verde). **(C)** Western blot de células tratadas con los siRNA contra HP1 α (α i, carril 4) o HP1 γ (γ i, carril 5) o HP1 α - γ ($\alpha\gamma$ i, carril 6). Como control de carga se usó MEK2. Para cuantificar la cantidad de proteína eliminada se cargaron distintas cantidades de la muestra control (10-30-100%, carriles 1, 2 y 3). Las células fueron analizadas 5 días después de la primera transfección. **(D)** Cuantificación del número de mitosis con Scc1-Myc en el centrómero.

1.3.5 La eliminación de HP1 α no afecta a la unión de Sgo1 al centrómero

Un trabajo reciente propone que HP1 α es necesaria para la presencia de Sgo1 en la región centromérica, y de esta forma contribuye a la acumulación de la Cohesina en esta región en mitosis (Yamagishi et al. 2008). Sin embargo, nosotros no detectamos defectos en esta acumulación de Cohesina al disminuir los niveles de HP1 α , HP1 γ , o ambas, como se explica en el apartado anterior. Decidimos por ello analizar la presencia de Sgo1 en las células tratadas con el siRNA que nosotros veníamos utilizando y con otros dos oligonucleótidos utilizados en el trabajo de Yamagishi y colaboradores (a los que denominaremos Y1 e Y2). Las células se

recogieron 3 días después de la primera transfección. Así mismo, antes de recoger las células se mantuvieron los cultivos 4 horas en presencia de colcemida para reproducir las condiciones experimentales descritas en el mencionado trabajo. Como puede verse en la Fig. 15A, los tres siRNAs tienen una eficiencia muy similar, y eliminan alrededor del 90% de HP1 α . Sin embargo, los oligonucleótidos Y1 e Y2 afectan a la proliferación celular, pues se observa un claro descenso en la viabilidad de los cultivos celulares trasfectados con estos siRNAs. Al analizar la localización de Sgo1 en los cromosomas mitóticos de estas células, sólo en el caso del siRNA Y2 se observa un incremento en la proporción de células que no muestran acumulación centromérica de Sgo1, pero no en los otros dos aún cuando la reducción de HP1 α es equivalente (Fig. 15A y B). Por otro lado, experimentos llevados a cabo en extractos de *X. laevis* también indican que la *immunodepleción* de HP1 α no impide la correcta localización de Sgo1 en la región centromérica (resultados no mostrados).

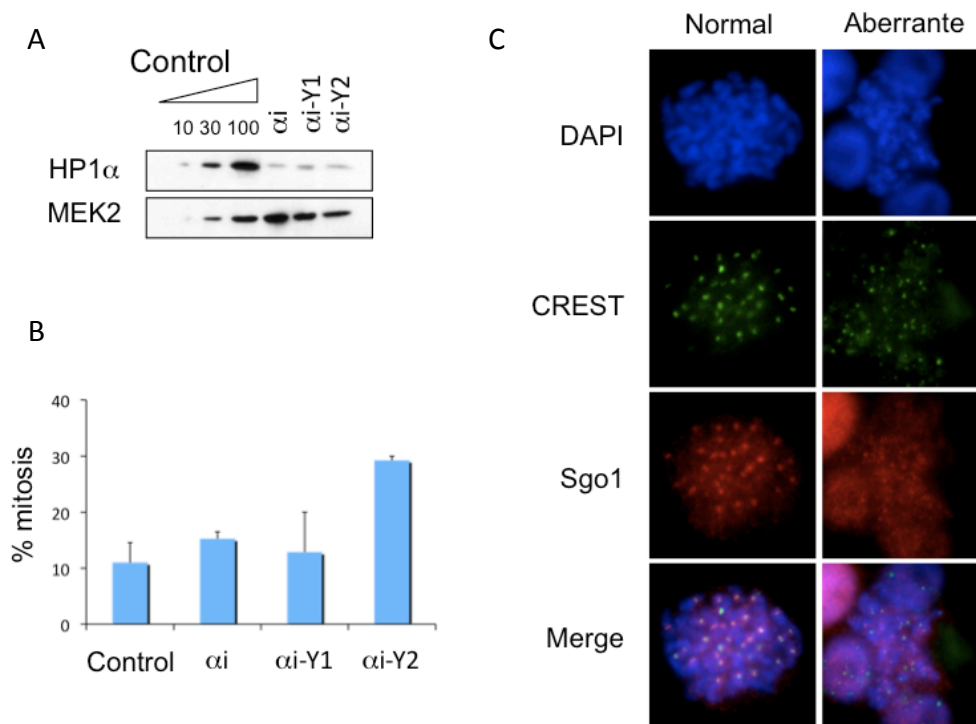


Figura 15. Efecto de la eliminación de HP1 α en la localización de Sgo1. **(A)** Western blot para medir los niveles de eliminación de HP1 α , en células tratadas con nuestro siRNA contra HP1 α (α i) y los siRNAs del artículo Yamagishi et al (α i-Y1 y α i-Y2). Las células fueron analizadas 3 días después de la primera transfección. Como control de carga se uso MEK2 y se uso una escalera a diferentes porcentajes (10-30-100%) del células no tratadas para calcular los niveles de eliminación tras el tratamiento con el siRNA. **(B)** Porcentaje de células en las cuales Sgo1 se encuentra no presente en el centrómero. Se contaron al menos 200 células en dos experimentos independientes. **(C)** Microscopía de fluorescencia de células sometidas a choque hipotónico y tratadas con anticuerpos contra Sgo1 (rojo), CREST (verde) y teñidas con DAPI (azul). Se presenta una célula normal con Sgo1 localizada en el centrómero y otra con un fenotipo aberrante en la que Sgo1 se encuentra más deslocalizada.

1.3.6 La eliminación de HP1 γ provoca defectos en mitosis

Los resultados mostrados hasta ahora indican que, a diferencia de lo que ocurre en *S. pombe*, las proteínas HP1 no son necesarias para la acumulación de Cohesina en la región centromérica de los cromosomas humanos. Es sin embargo posible que el funcionamiento de la Cohesina en esta región dependa de algún modo de las proteínas HP1.

Para ver si la cohesión de los cromosomas se ve afectada en células en las que los niveles de las proteínas HP1 se han reducido mediante ARNi analizamos la morfología de los cromosomas mitóticos. Antes de recoger las muestras, los cultivos se dejaron durante 2 horas en medio con colcemida para evitar la entrada en anafase. Antes de fijar, las células se someten a un choque hipotónico que aumenta el volumen celular y contribuye a separar los cromosomas dentro de los límites impuestos por la membrana celular. Tras la fijación y permeabilización, las muestras se incuban con anticuerpos contra SMC2, una subunidad de la Condensina que marca el eje de cada cromátida hermana, y Aurora B, que en cromosomas metafásicos se acumula en la región entre los centrómeros hermanos (Fig. 16A). En las células control la mayor parte de las metafases presentan cromosomas con las cromátidas perfectamente apareadas y tinción de Aurora B en el lugar de la constricción primaria. En algunas células, sin embargo, el apareamiento entre las cromátidas hermanas parece más relajado, y en algunos cromosomas la señal de Aurora B se deslocaliza a lo largo de los brazos cromosómicos (fenotipo 1, segunda columna). En una tercera clase de células, las cromátidas hermanas se encuentran mucho más separadas, la señal de Aurora B apenas se detecta, y los cromosomas parecen haberse compactado más de lo normal (fenotipo 2, tercera columna). Este último fenotipo es común en células en las que se han reducido los niveles de Cohesina (Losada et al. 2005). En el caso de los cultivos trasfectados con siRNAs de HP1 α o HP1 β no observamos un incremento importante en la aparición de estos defectos respecto al control, ni a 3 ni a 5 días después de la primera transfección (Fig. 16C). Sin embargo, en las células con niveles reducidos de HP1 γ sí se observa un incremento significativo en el porcentaje de células mitóticas que presentan los fenotipos 1 y 2, este último más apreciable 5 días después de la primera transfección.

Además de examinar la morfología cromosómica, las mismas células se analizaron mediante tinción con anticuerpos contra α -tubulina, que nos permite observar los husos mitóticos, y suero CREST (Fig. 16B). En este caso se omitió el tratamiento con colcemida, así como el choque hipotónico. En la mayor parte de las metafases de las muestras control, los cromosomas se alinean en el ecuador del huso bipolar, formando la placa metafásica (primera columna de la Fig. 16B).

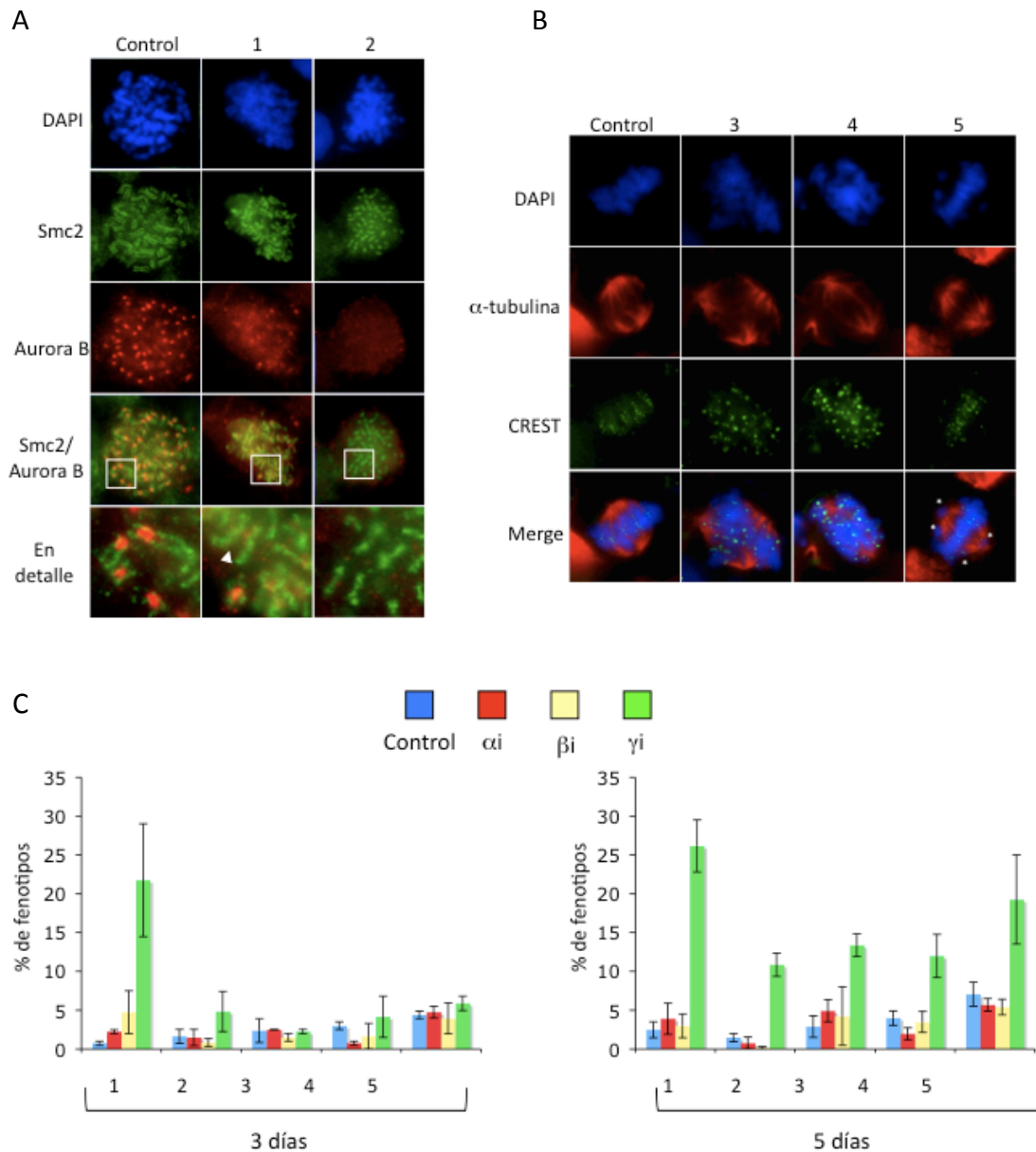


Figura 16. Defectos observados tras la eliminación individual de cada una de las isoformas de HP1. (A) Microscopía de fluorescencia de células tratadas con choque hipotónico previamente a la fijación. Las células fueron tratadas con anticuerpos contra SMC2 (Condensina, en verde) que marca el eje de las cromátidas, Aurora B (en rojo) que marca el centrómero y teñidas con DAPI (azul). Se definieron dos fenotipos aberrantes 1 y 2 (para más detalles ver el texto). En la última fila se muestran los detalles recuadrados. **(B)** Microscopía de fluorescencia de células mitóticas fijadas con 2% PFA-0,5% tritón X. Las células se marcaron con anticuerpos contra α -tubulina (rojo), CREST (verde) y DAPI (azul). Se definieron varios fenotipos aberrantes: mitosis con múltiples husos (3), pseudoanafases (4) y fallos en alineamiento (5). Los asteriscos indican los cromosomas mal alineados. Para más detalle leer el texto. **(C)** Cuantificación de cada uno de los defectos observados tras 3 o 5 días después de la primera transfección (siRNA usados contra HP1 α (α), HP1 β (β) o HP1 γ (γ)). En el caso de los fenotipos 1 y 2 el porcentaje se estimó respecto al número de mitosis, mientras que el fenotipo 3, 4 y 5 respecto al número total de prometáfases/metáfases. Se contaron para cada caso como mínimo 400 células en al menos dos experimentos independientes.

RESULTADOS

Desviaciones de esta situación son: husos multipolares (fenotipo 3, segunda columna), pseudoanafases en las que la célula comienza a separar sus cromosomas antes de que estos alcancen la placa metafásica (fenotipo 4, tercera columna) y metafases con varios cromosomas - entre uno y cuatro - que no se han conseguido situar todavía en la placa metafásica (fenotipo 5, cuarta columna). Si bien en las muestras recogidas 3 días después de la primera transfección apenas se encuentran estos fenotipos en ningún caso (Fig. 16C, gráfico de la izquierda), su porcentaje aumenta considerablemente en el caso de la eliminación de HP1 γ en las muestras recogidas 5 días después de la primera transfección (Fig. 16C, gráfico de la derecha).

Es posible que las tres isoformas de HP1 tengan funciones parcialmente redundantes de modo que al eliminar una de ellas las otras dos puedan suplir su falta. Por ello, decidimos intentar reducir los niveles de las tres isoformas simultáneamente combinando los tres oligos de siRNA. Este experimento se repitió muchas veces porque en general la reducción de los niveles que obteníamos para cada isoforma era considerablemente menor que la observada en la transfección de un solo siRNA. El análisis de los fenotipos mitóticos descritos en el párrafo anterior se llevó a cabo 5 días después de la primera transfección en células en las que los niveles de cada una de las tres isoformas se había reducido por debajo del 10% (Fig. 17A). En estas muestras se observa que la cuantía de los defectos no aumenta apenas con respecto a los obtenidos tras eliminar HP1 γ sola (Fig. 17B). Así, concluimos que estos defectos son debidos a la reducción de HP1 γ .

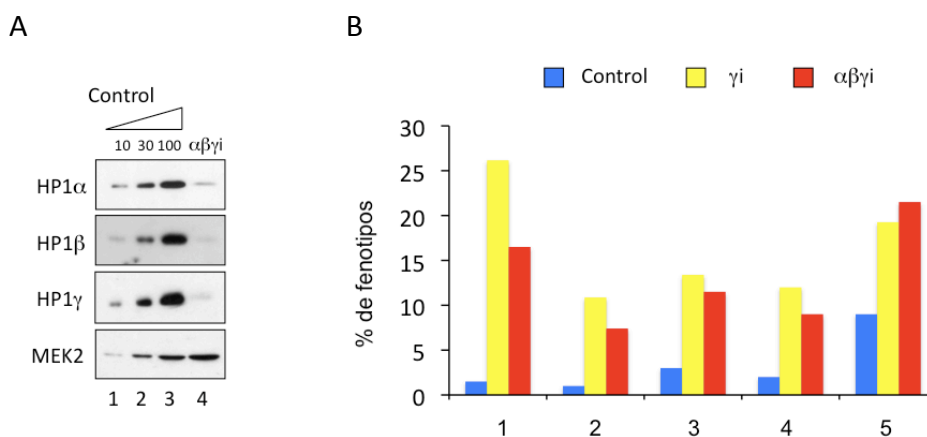


Figura 17. Triple eliminación de las isoformas de HP1 tras 5 días desde la primera transfección. (A) Análisis mediante *western blot* de la eliminación de HP1 en células tratadas con los siRNA (al mismo tiempo) contra HP1 α (α i), HP1 β (β i) y HP1 γ (γ i) (carril 4). Como control de carga se usó MEK2 y para cuantificar los niveles de proteína eliminada mediante ARNi se cargaron distintas cantidades de la muestra control (10-30-100%, carriles 1, 2 y 3). **(B)** Cuantificación de los defectos observados. El eje X representa los distintos fenotipos observado en las eliminaciones individuales (Fig. 16). Para cada condición se contaron al menos 200 células. Se han añadido las frecuencias de los fenotipos observados tras la eliminación individual de HP1 γ para comparar con la triple eliminación de HP1.

1.3.7 La eliminación de HP1 γ no afecta a la acumulación del CPC en la heterocromatina pericentromérica en interfase

El CPC (*Chromosome Passenger Complex*) se acumula en las regiones de heterocromatina pericentromérica durante la fase G2, donde colocaliza con las proteínas HP1 (Fig. 18A). Se ha descrito una interacción directa de las proteínas HP1 con INCENP, uno de los componentes de CPC junto a la quinasa Aurora B, y las proteínas Survivina y Borealina (Ainsztein et al. 1998). A la vista de los resultados expuestos en el epígrafe anterior, según los cuales se observa una deslocalización de Aurora B en los cromosomas mitóticos de células con niveles reducidos HP1 γ , nos preguntamos si esta deslocalización podría ser el resultado de un problema en la asociación inicial del CPC a la heterocromatina durante G2. Sin embargo, tras la eliminación de HP1 γ no se observan alteraciones en la acumulación de INCENP en focos (Fig. 18B). Lo mismo es cierto para células con niveles reducidos HP1 α o HP1 β . Así pues, el efecto HP1 γ sobre la localización centromérica del CPC en el centrómero sólo se pone de manifiesto durante mitosis.

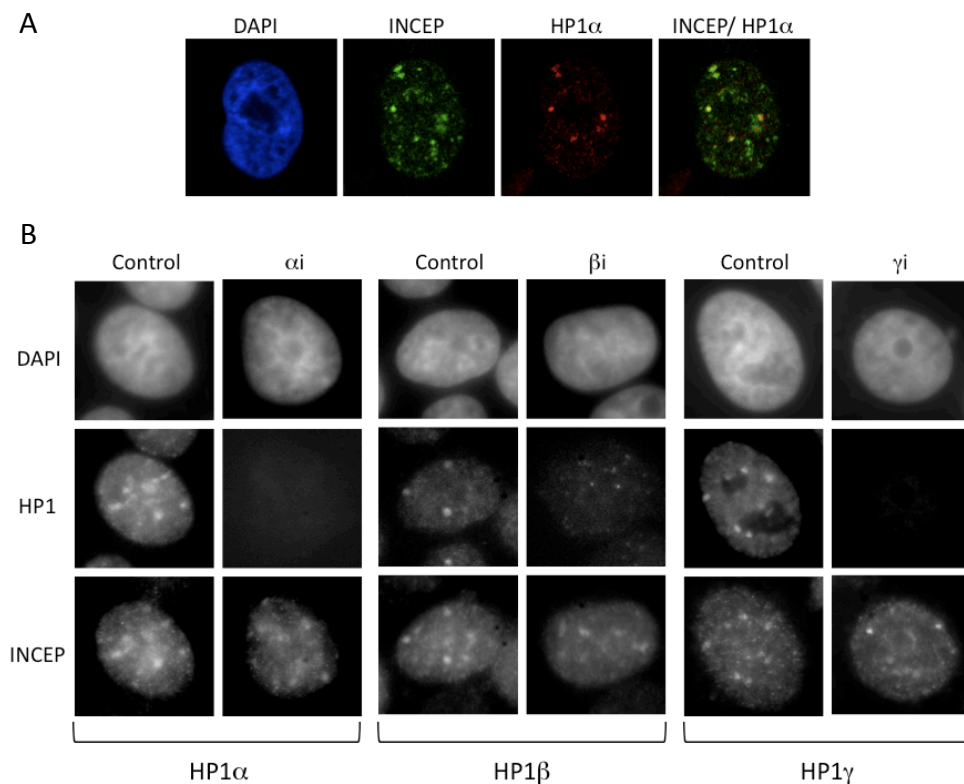


Figura 18. Efecto de la eliminación de HP1 sobre la acumulación del CPC durante G2. (A) Microscopía confocal de núcleos marcados con anticuerpos contra HP1 α (en rojo) e INCENP (subunidad del CPC, en verde) y que han sido previamente preextraídos antes de la fijación. Además las células fueron teñidas con DAPI (en azul). (B) Microscopía de fluorescencia con preextracción en células tratadas con los siRNA contra HP1 α (α i), HP1 β (β i) o HP1 γ (γ i). El experimento se analizó 5 días después de la primera transfección. Las células fueron marcadas con anticuerpos contra HP1 e INCENP y teñidas con DAPI.

2. Efecto de los tratamientos farmacológicos con drogas epigenéticas sobre la regulación de la Cohesina

2.1 El tratamiento con TSA y AZA afecta a la organización de la heterocromatina y a la localización de HP1

Una forma alternativa de estudiar si la función de las proteínas HP1 afecta de alguna manera a la regulación de la Cohesina es mediante el uso de drogas que alteran las marcas epigenéticas de la cromatina y que afectan de este modo a la unión de HP1. Por otro lado, es posible que estas marcas epigenéticas influyan en la acumulación preferencial de Cohesina en la heterocromatina pericentromérica incluso de forma independiente de HP1. Para abordar estas cuestiones se eligieron Tricostatina A o TSA, un inhibidor genérico de deacetilasas de histonas (HDACs, *Histone deacetylases*) y 5-aza-2'deoxicitidina o AZA, un inhibidor de ADN-metil-transferasas (DNMT, *DNA-methyl-transferases*).

En el caso del TSA decidimos seguir el protocolo propuesto por el grupo de la Dra. G. Almouzni, según el cual la droga se aplica a concentraciones bajas (entre 30-40 ng/ml) durante tiempos largos (Taddei et al. 2001; Taddei et al. 2005). La adición de 30 ng/ml TSA al medio de cultivo durante cinco días produce un aumento notable en el estado de acetilación de las histonas, tal y como refleja la tinción con un anticuerpo que reconoce la Lisina 8 de la histona H4 acetilada (H4K8Ac, Fig. 19A y 19D). Los cinetocoros se relocalizan hacia la periferia del núcleo (Fig. 19D), y se pierden los focos de HP1 las células en interfase (Fig. 20). Además, se observa un aumento de defectos en mitosis, principalmente la aparición de husos multipolares y micronúcleos, que evidencian una segregación cromosómica aberrante (Fig. 21).

En el caso del tratamiento con AZA, se probaron dos concentraciones distintas basándonos en publicaciones anteriores (Nieto et al. 2004): 1 μ M y 10 μ M. En el caso de esta última, sin embargo, a las 48 horas el índice mitótico se reducía drásticamente (Fig. 19B) por lo cual se descartó. La presencia de 1 μ M AZA durante 5 días en el medio de cultivo conduce a una disminución de la metilación de la heterocromatina pericentromérica, tal y como indica el análisis de la metilación del ADN satélite 2 (Sat2) mediante tratamiento de bisulfito (Espada et al. 2004) (Fig. 19C). Por otro lado y de manera similar al tratamiento con TSA, también se observa en las células, una relocalización de los cinetocoros hacia la periferia del núcleo y un aumento en la acetilación de histonas (Fig. 19D), así como deslocalización de HP1 (Fig. 20) y un incremento en el número de mitosis aberrantes (Fig. 21).

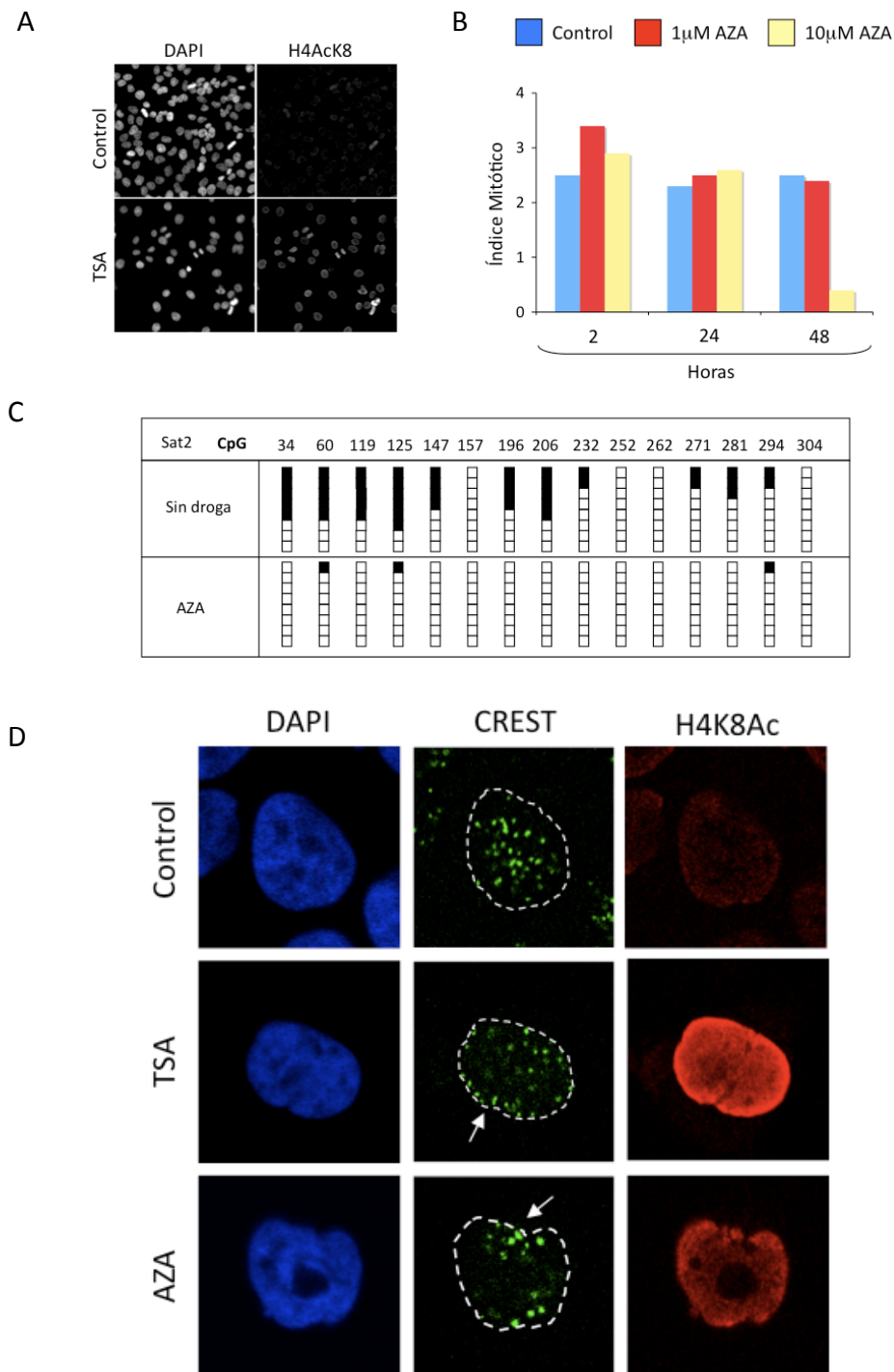


Figura 19. Efecto del TSA y AZA en células HeLa. (A) Microscopía de fluorescencia de células tratadas con 30 ng/mL de TSA, fijadas con 2% PFA y tratadas con anticuerpo contra histona H4 acetilado en la lisina 8. **(B)** Análisis del índice mitótico (número de mitosis / número total de células) en células tratadas con diferentes concentraciones de AZA (1 μ M y 10 μ M) y a diferentes tiempos. Se contaron al menos 1000 células. **(C)** 1 μ M AZA disminuye la metilación del ADN (analizado mediante tratamiento con bisulfito) de la heterocromatina pericentromérica (satélite 2). **(D)** Microscopía confocal de células tratadas con 30 ng/mL TSA y 1 μ M AZA, fijadas con 2% PFA y tratadas con anticuerpos contra H4 acetilada en lisina 8 (rojo) y CREST (verde). Las células fueron además teñidas con DAPI (azul). En la columna de CREST se ha dibujado con una línea blanca intermitente el contorno del núcleo. Las flechas indican la relocalización de los cinetocoros hacia la periferia.

RESULTADOS

La mayor acetilación de histonas tras tratar con AZA, puede ser consecuencia de que la unión de las HDACs a cromatina se ve facilitada en muchos casos por las proteínas que unen grupos metilo (MBP, *Methyl Binding Proteins*). Cuando disminuye la metilación por el tratamiento con AZA, las MBPs no se unen al ADN y esto interfiere a su vez en la unión de las HDACs (Rountree et al. 2001).

El tratamiento con AZA también provoca la agregación de cinetocoros. Como puede observarse en la figura 19D, las señales que produce el suero CREST son de mayor grosor que en las células control. Este efecto recuerda al descrito en células de pacientes con el síndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*) que presentan una baja metilación de los satélites pericentroméricos debido a la mutación del gen que codifica a la DNMT3B (Xu et al. 1999). Se ha propuesto que la alteración de las marcas epigenéticas de la cromatina centromérica altera la conformación de la misma y produce, entre otros efectos, la asociación de las regiones centroméricas de múltiples cromosomas durante interfase.

Además de estos efectos tanto TSA como AZA promovían un aumento en la aparición de núcleos de mayor tamaño (Fig. 22) que los normales. La aparición de estos núcleos también era esperada para el TSA por observaciones que anteriormente se habían hecho (Bartova et al. 2005).

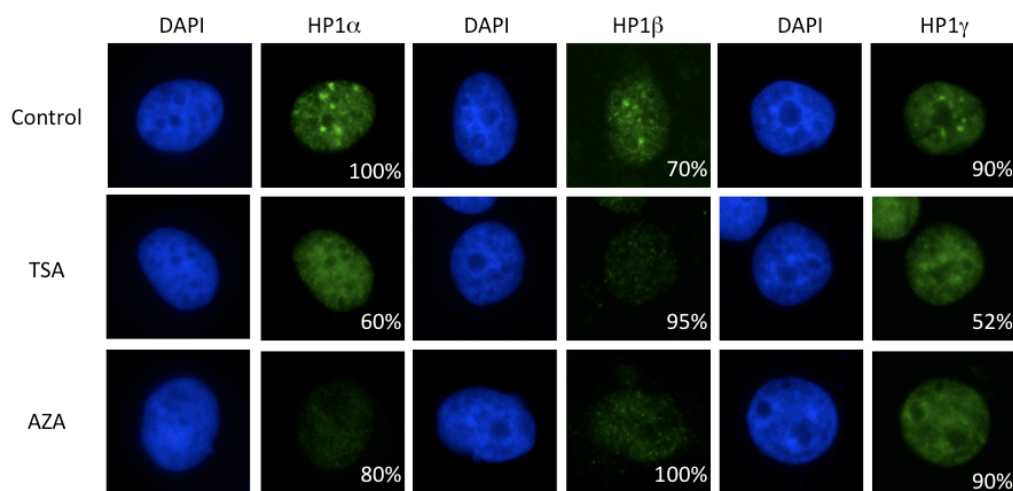


Figura 20. TSA y AZA promueven que las tres isoformas de HP1 se deslocalicen de los focos de heterocromatina pericentromérica. Microscopía de fluorescencia con preextracción de células tratadas con 30 ng/mL TSA o 1 μ M AZA y marcadas con diferentes anticuerpos contra cada una de las isoformas de HP1 (verde). Las células además se tiñeron con DAPI (azul). Los números que aparecen dentro de las fotos representan el porcentaje de células con ese fenotipo respecto al total de interfases.

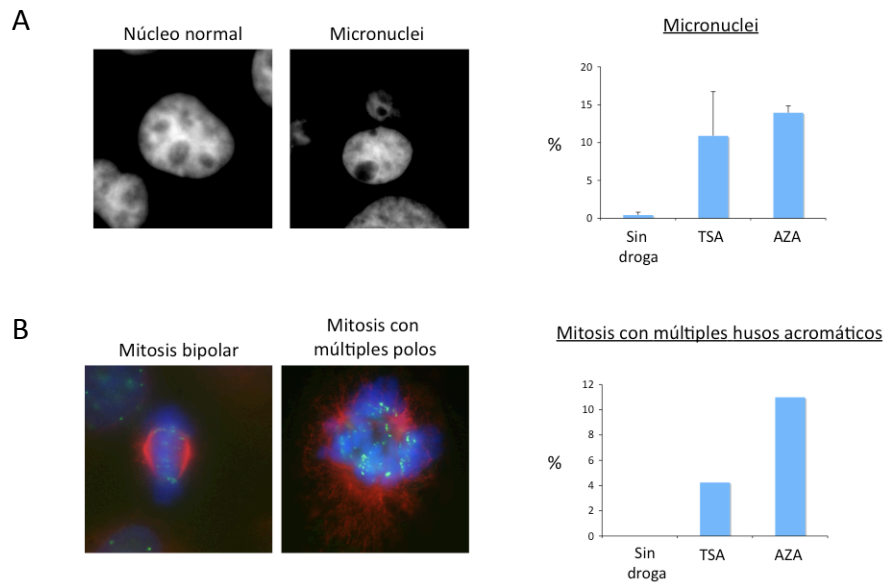


Figura 21. TSA y AZA generan defectos en mitosis. (A) Microscopía de fluorescencia de células teñidas con DAPI. En la gráfica de la derecha se representa el porcentaje de micronúcleos (respecto a interfases) al tratar con 30 ng/mL TSA, 1 μ M AZA o sin droga. Se contaron al menos 1000 células en dos experimentos independientes. **(B)** Microscopía de fluorescencia mitosis tratadas con anticuerpos contra α -tubulina (rojo), CREST (verde) y teñidas con DAPI (azul). En la gráfica de la derecha se representa el porcentaje (respecto a mitosis totales) de mitosis con múltiples polos del huso acromático tras tratar con 30 ng/mL TSA o 1 μ M AZA. Se contaron al menos 100 células.

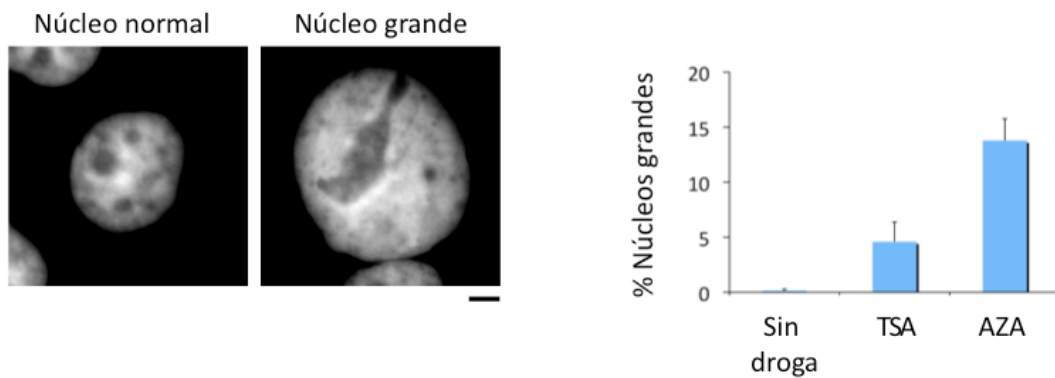


Figura 22. El tratamiento con las drogas también incremento el número de células que presentaban núcleos de mayor tamaño. Microscopía de fluorescencia de núcleos interfásicos teñidos con DAPI. El porcentaje de la gráfica representa el % de núcleos grandes respecto al número de núcleos interfásicos totales. Se contaron al menos 1000 células en dos experimentos independientes. La barra de escala es de 5 μ m.

2.2 Los tratamientos con AZA y TSA no afectan a la carga de Cohesina

Para estudiar si la alteración en las marcas epigenéticas (metilación de ADN y acetilación de histonas) y la consiguiente deslocalización de HP1 afectan a la carga de Cohesina en cromatina, se llevó a cabo el fraccionamiento bioquímico de los cultivos tratados con TSA y AZA, o sin

RESULTADOS

droga como control. Como se ve en la Fig. 23A, la mayor parte de la Cohesina aparece en todos los casos en la fracción unida a cromatina, y en cantidades equivalentes (carriles 4, 8 y 12).

Para estudiar específicamente la población de Cohesina presente en la región centromérica, se repitieron los tratamientos de TSA y AZA en la línea celular que expresa Scc1-myc. Al cuantificar el número de células mitóticas que presentan tinción centromérica de Scc1-myc no observamos ninguna diferencia entre los cultivos no tratados y tratados con las drogas (Fig. 23B). Este resultado refuerza la conclusión de que la correcta localización de las proteínas HP1 en la heterocromatina centromérica no es esencial para la presencia de Cohesinas en esta región.

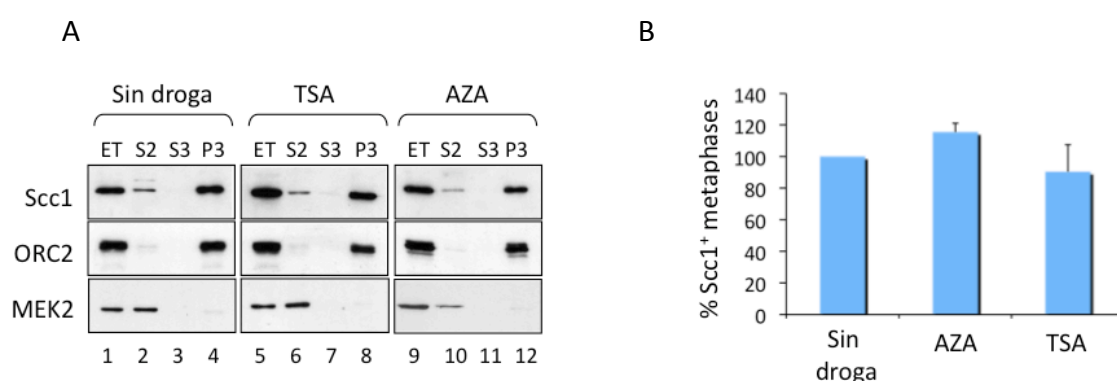


Figura 23. TSA y AZA no afectan a la carga de Cohesina ni en los brazos ni en el centrómero. (A) Fraccionamiento de cromatina de células tratadas con 30 ng/mL TSA o 1 μ M AZA. ORC2 y MEK2 son los controles del fraccionamiento. ET: Extracto total. S2: Fracción citosólica. S3: Fracción nucleoplasmática. P3: Fracción enriquecida en cromatina. Carriles 1-4 células no tratadas, carriles 5-8 células tratadas con 30 ng/mL TSA y carriles 9-12 células tratadas con 1 μ M AZA. **(B)** Cuantificación de la proporción de células que presentaba Scc1-Myc en el centrómero tras el tratamiento con las drogas (para más detalle ver figura 14).

3. Papel de la fosforilación de HP1 γ durante mitosis

3.1 Fosforilación de HP1 γ en la serina 93 durante mitosis

Evidencias recientes muestran que las proteínas HP1 pueden ser objeto de múltiples modificaciones post-traduccionales: fosforilaciones, sumoilaciones, acetilaciones o metilaciones (Leroy et al. 2009; Lomberg et al. 2006a). Sin embargo, la funcionalidad de la mayor parte de estas modificaciones se desconoce. Dos excepciones son la fosforilación de HP1 γ en la serina 93, implicada en regulación de la transcripción y en la formación de SAHFs, y la fosforilación de HP1 β en la Treonina 51, que es importante para la reparación de las roturas de ADN de doble cadena en la heterocromatina (Lomberg et al. 2006a; Zhang et al. 2007a;

Ayoub et al. 2008). Se trata, pues, de modificaciones asociadas al núcleo interfásico. Experimentos de electroforesis bidimensional llevaron a Minc y colaboradores (1999) a sugerir hace diez años que HP1 α y HP1 γ (pero no HP1 β) se modifican de forma específica en mitosis, pero la naturaleza de estas modificaciones, los residuos implicados y las enzimas que las llevan a cabo se desconocen.

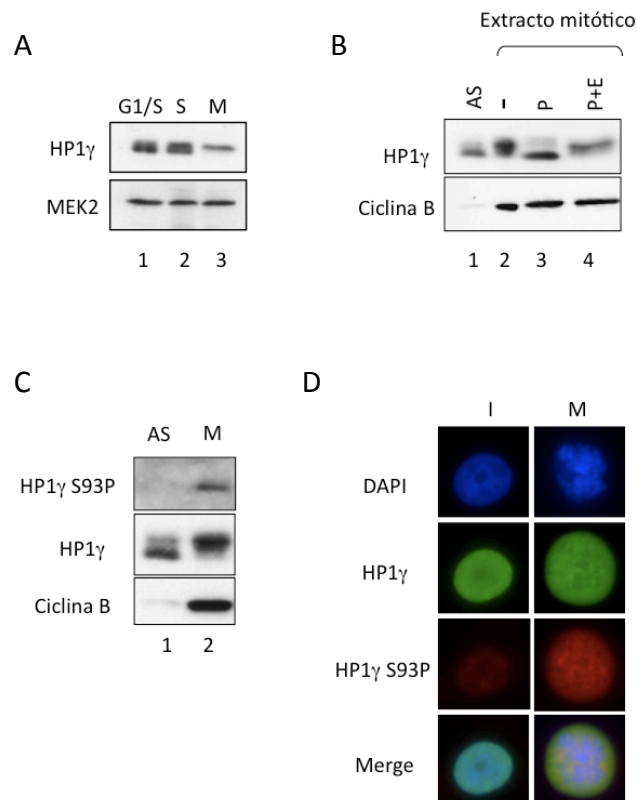


Figura 24. HP1 γ es fosforilada en la S93 durante mitosis. (A) Células sincronizadas en diferentes estadios del ciclo mediante doble bloqueo con timidina (para más detalle consultar el capítulo de Materiales y métodos): G1/S (carril 1), S (carril 2) y M (carril 3). El *western blot* se llevó a cabo contra HP1 γ . Como control de carga se usó MEK2. (B) Ensayo fosfatasa en diferentes condiciones: AS (cultivo asincrónico, carril 1), - (extracto enriquecido en células mitóticas por arresto con colcemida, carril 2), P (extracto mitótico tratado con fosfatasa, carril 3), P+E (extracto mitótico tratado con fosfatasa y con EDTA (inhibidor de la fosfatasa, carril 4). (C) *Western blot* para indicar que HP1 γ es fosforilada en la serina 93 durante mitosis. AS y M se refieren a extracto asincrónico y extracto mitótico respectivamente. (D) Microscopía de fluorescencia con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo). Las células también se marcaron con DAPI (azul) y contra HP1 γ (verde). I y M significan interfase y mitosis respectivamente.

En los experimentos con las proteínas HP1 expuestos en párrafos anteriores observamos que en extractos celulares de cultivos asincrónicos el *western blot* con anticuerpos que reconocen específicamente HP1 γ se detecta, además de la banda principal, una banda minoritaria de migración más lenta (Fig. 10A). Al repetir el *western blot* en extractos de células sincrónicas se observa que esta forma modificada de HP1 γ , de menor movilidad en gel, está presente en todas las fases del ciclo, pero es la mayoritaria - si no la única - en células

mitóticas (carril 3, Fig. 24A). Para testar si esta modificación es una fosforilación, extractos de células mitóticas se trataron con fosfatasa lambda en ausencia o presencia de EDTA, un inhibidor de la actividad de esta enzima (Fig. 24B). El tratamiento con fosfatasa elimina casi por completo la banda de menor movilidad (carril 3) en tanto que este efecto se revierte en presencia del inhibidor (carril 4). Este resultado sugiere que, efectivamente, la forma de HP1 γ que migra más lentamente en el gel de acrilamida y cuya presencia es mayoritaria en células mitóticas corresponde a una forma fosforilada de la proteína. Es más, esta forma es reconocida por un anticuerpo fosfoespecífico generado por Lomberg y *col.* (2006) contra un péptido de 13 aa que incluye a la serina 93 fosforilada (Fig. 24C). En tinciones de inmunofluorescencia con este mismo anticuerpo se observa de nuevo que la señal obtenida es mucho mayor en células mitóticas que en interfásicas, en tanto que los niveles totales de HP1 γ permanecen constantes (Fig. 24D).

3.2 Localización de HP1 γ -S93P

Durante interfase, la forma fosforilada de HP1 γ en la serina 93 - HP1 γ -S93P de aquí en adelante - aparece formando focos que no colocalizan con los focos de heterocromatina en los que se acumula HP1 γ (Fig. 25A). Este resultado está de acuerdo con la idea que la fosforilación de HP1 γ en este residuo interfiere con su actividad de silenciamiento y con la observación de que esta modificación aparece en cromatina que se está transcribiendo, donde colocaliza con la ARN polimerasa II fosforilada (Lomberg et al. 2006a). Otra marca característica de este tipo de cromatina abierta, transcripcionalmente activa, es H3S10P (histona H3 fosforilada en la serina 10). Como se muestra Fig. 25B, la tinción de núcleos interfásicos con anticuerpos que reconocen H3S10P y HP1 γ -S93P es muy similar, lo que sugiere que ambas se encuentran en las mismas regiones.

En mitosis, sólo una pequeña parte de HP1 γ permanece unida a la cromatina en tanto que el resto está soluble en el citosol. En células tratadas con detergente antes de la fijación para eliminar esta fracción soluble, la tinción de inmunofluorescencia con el anticuerpo que reconoce HP1 γ -S93P muestra que la proteína se localiza principalmente en centrosomas y centrómeros (Fig. 26). Los centrosomas organizan los polos del huso y en ellos se detecta también la quinasa Aurora A (Fig. 26 A y B). En los centrómeros, HP1 γ -S93P localiza junto con la proteína del cinetocoro CENP-E (Fig. 26C). Además, esta modificación de HP1 γ en mitosis parece estar conservada en otros organismos. Por ejemplo, en cromosomas obtenidos *in vitro*

en extractos de huevos de *Xenopus laevis*, HP1 γ -S93P se acumula en la región centromérica, donde colocaliza con la quinasa mitótica Bub1 (Fig. 26D).

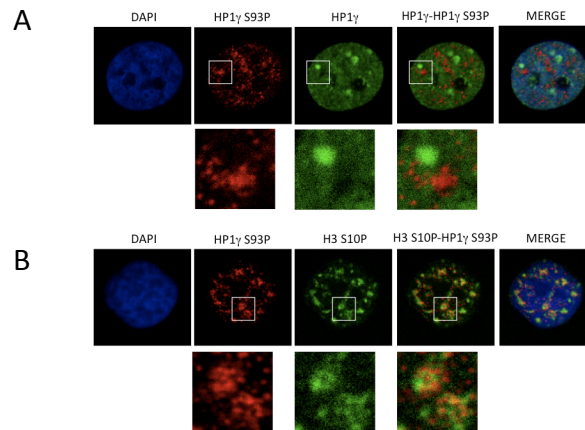


Figura 25. HP1 γ -S93P en interfase. (A) Microscopía confocal de células tratadas con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y HP1 γ (verde). Las células se tiñeron además con DAPI (azul). (B) Microscopía confocal de células tratadas con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y H3S10P (verde). Las células se tiñeron además con DAPI (azul). En ambos casos las células fueron preextraídas para eliminar a fracción unida a cromatina.

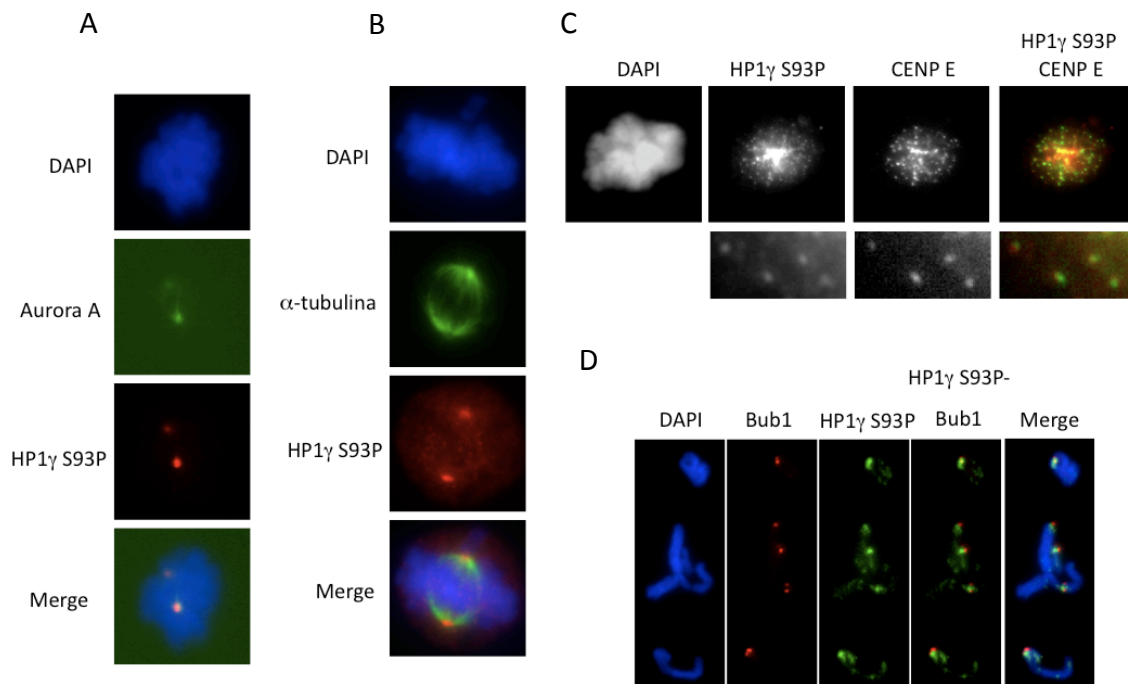


Figura 26. Localización de HP1 γ -S93P durante mitosis. (A) Microscopía de fluorescencia de células tratadas con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y Aurora A (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). (B) Microscopía de fluorescencia de células tratadas con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y α -tubulina (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). (C) Microscopía de fluorescencia de células preextraídas y tratadas con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y CENP E (verde). Las células fueron teñidas con DAPI. (D) Microscopía de fluorescencia de cromosomas de *Xenopus laevis* y tratadas con anticuerpos contra Bub1 (rojo) y HP1 γ -S93P (verde). En azul aparece el ADN teñido con DAPI.

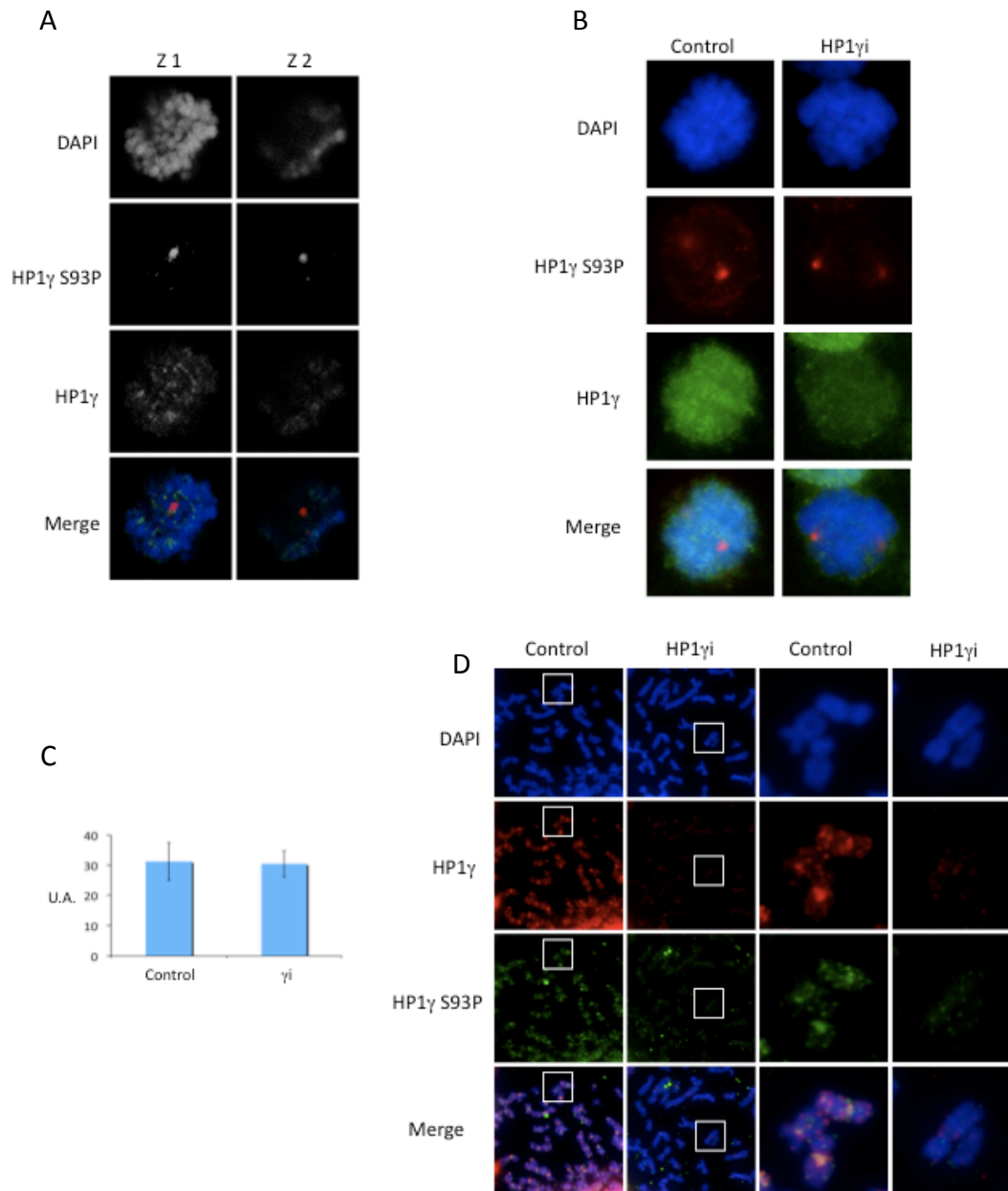


Figura 27. La señal HP1 γ -S93P en el centrómero es específica, no en cambio la señal centrosómica. (A) Diferentes planos (z) tomados con microscopio confocal en células preextraídas y marcadas con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y HP1 γ total (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(B)** Microscopía de fluorescencia y ARNi de HP1 γ (γ i) y posterior tinción contra HP1 γ -S93P (rojo) y HP1 γ (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(C)** Cuantificación de la señal centrosómica en células control y tratadas con el siRNA de HP1 γ . U.A. son unidades arbitrarias de intensidad. Se cuantificaron por condición 10 centrosomas. **(D)** Microscopía de fluorescencia de cromosomas metafásicos obtenidos por citospín y marcados con anticuerpos contra HP1 γ (rojo), HP1 γ -S93P (verde) y teñidos con DAPI (azul). A la derecha se muestra el detalle de los recuadros.

La tinción de los anticuerpos de HP1 γ -S93P en el centrosoma es difícil de entender. Si bien en alguna publicación se ha descrito la presencia de HP1 α y HP1 γ en este orgánulo (Minc et al. 1999; Auth et al. 2006), en nuestras manos no hay colocación de HP1 γ y HP1 γ -S93P en el centrosoma (Fig. 27A). Para comprobar la especificidad de la tinción de HP1 γ -S93P

repetimos la inmunofluorescencia en células tratadas con siRNA de HP1 γ . Como puede verse en la Fig. 27B, la eliminación de HP1 γ no conlleva la pérdida de la señal centrosómica y ni siquiera se observa una reducción significativa en la intensidad de dicha señal (Fig. 27C). En cambio, en preparaciones de cromosomas mitóticos se observa que la tinción centromérica tanto de HP1 γ como de HP1 γ -S93P está presente en las células control y desaparece tras el tratamiento con el siRNA de HP1 γ (Fig. 27D). Por lo tanto, la señal de HP1 γ -S93P en el centrosoma parece inespecífica. En cambio, sí podemos concluir que la población de HP1 γ que permanece unida a la región centromérica de los cromosomas mitóticos está fosforilada en la serina 93.

3.3 La fosforilación de HP1 γ en la serina 93 depende de Aurora B in vivo

La serina 93 de HP1 γ se encuentra inmersa dentro de una secuencia consenso de fosforilación por la quinasa Aurora B (Fig. 28A). Además, la fosforilación de HP1 γ ocurre al mismo tiempo que la de la histona H3 en la serina 10, que lleva a cabo Aurora B: en ambos casos la fosforilación comienza en profase y desaparece en telofase (Fig. 28B). Estos dos resultados sugieren que Aurora B podría ser la quinasa responsable de fosforilar HP1 γ . Para examinar esta posibilidad se redujeron los niveles celulares de Aurora B mediante ARNi. Este tratamiento disminuye considerablemente los niveles totales de HP1 γ -S93P (Fig. 29A) y elimina la señal centromérica del anticuerpo fosfoespecífico, y no la centrosómica (Fig. 29B).

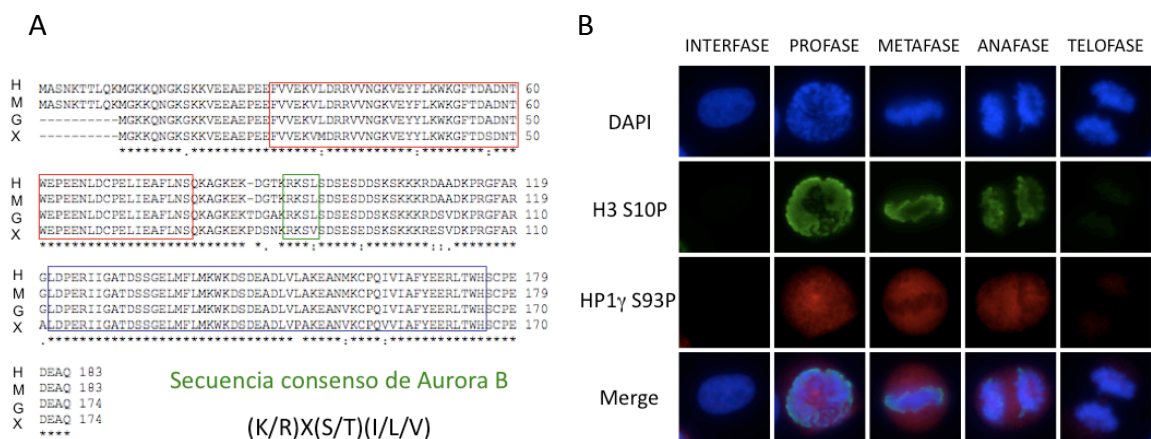


Figura 28. Buscando la quinasa que fosforila HP1 γ en la serina 93. (A) Alineamiento de secuencias de HP1 γ de diferentes especies (H: *Homo sapiens*, M: *Mus Musculus*, G: *Gallus gallus*, X: *Xenopus laevis*). En rojo el dominio *chromoshadow* y en azul el *chromodomain*. En verde aparece la secuencia consenso para la fosforilación por Aurora B, y que es donde se localiza la S93 de HP1 γ humana. **(B)** Microscopía de fluorescencia con anticuerpos contra HP1 γ -S93P (rojo) y H3S10P (verde) en células en diferentes estadios de mitosis. Se tiñeron las células con DAPI (azul).

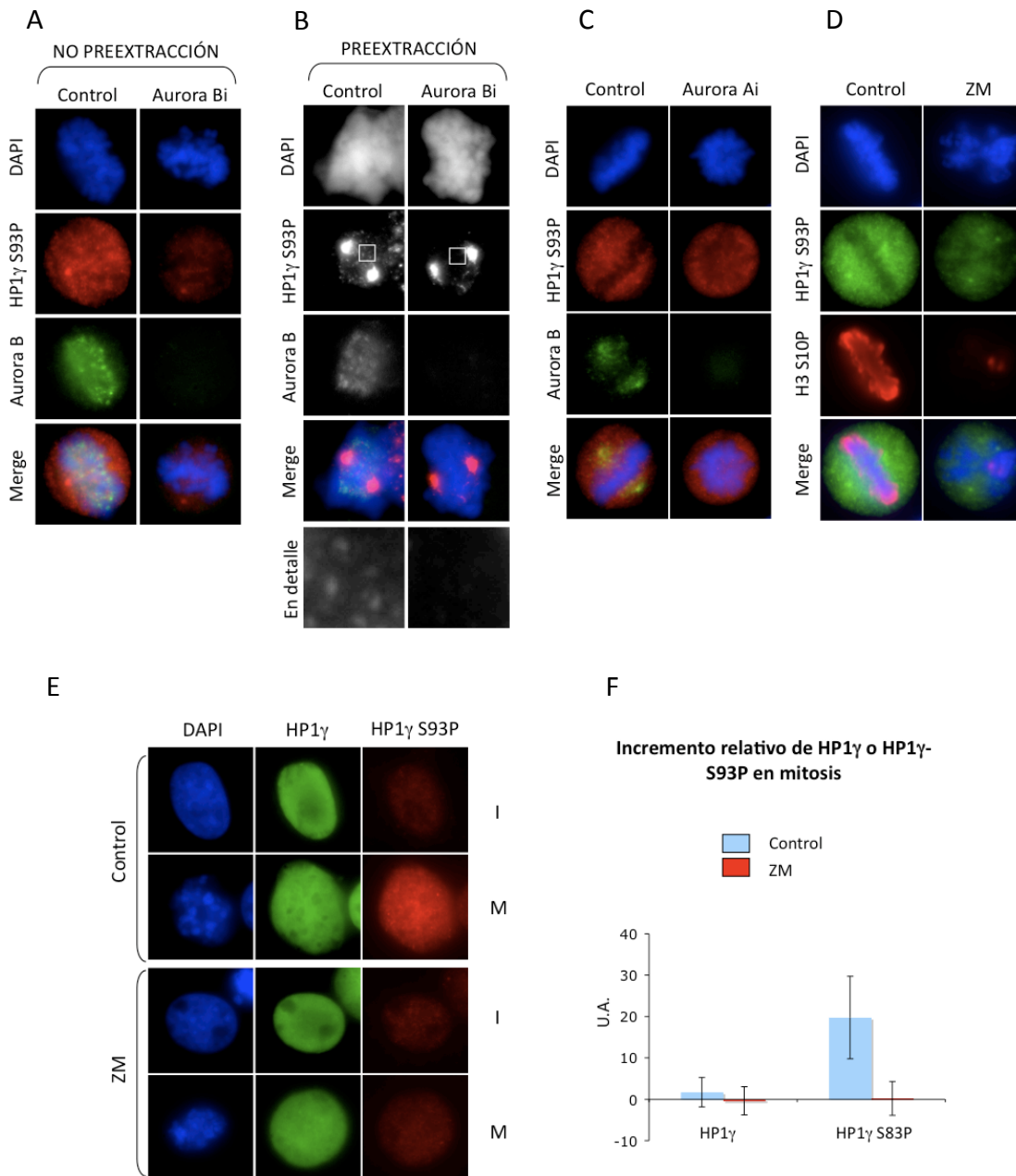


Figura 29. Aurora B o un mecanismo dependiente de esta quinasa fosforila HP1γ en la serina 93 in vivo. (A) Microscopía de fluorescencia en células tratadas con el siRNA de Aurora B (Aurora Bi) sin preextracción y marcadas posteriormente con anticuerpos contra HP1γ-S93P (rojo) y Aurora B (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(B)** Microscopía de fluorescencia en células tratadas con el siRNA de Aurora B (Aurora Bi) con preextracción y marcadas posteriormente con anticuerpos contra HP1γ-S93P (rojo) y Aurora B (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(C)** Microscopía de fluorescencia en células tratadas con el siRNA de Aurora A (Aurora Ai) con post-fijación con metanol y marcadas posteriormente con anticuerpos contra HP1γ-S93P (rojo) y Aurora A (verde). Tinción con DAPI (azul). **(D)** Tratamiento con el inhibidor ZM447439. Células marcadas con anticuerpos anti HP1γ-S93P (verde) y H3S10P (rojo). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(E)** Tratamiento con el inhibidor ZM447439. Células marcadas con anticuerpos anti HP1γ-S93P (rojo) y HP1γ (verde). Las células fueron teñidas con DAPI (azul). **(F)** Cuantificación de las intensidades totales de las señales de HP1γ y HP1γ-S93P de la figura 29E. Se representa en incremento relativo de la señal de HP1γ o HP1γ-S93P de interfase a mitosis. Por cada condición se cuantificaron al menos 40 células.

Por el contrario, si eliminamos una quinasa relacionada con Aurora B, Aurora A y con una secuencia consenso de fosforilación similar, no disminuye la señal de HP1 γ -S93P (Fig. 29C). También al tratar las células con ZM 447439, un inhibidor que ha mostrado ser bastante específico para Aurora B (Ditchfield et al. 2003), no sólo disminuye la fosforilación de su sustrato más conocido, H3S10P, sino también la de HP1 γ en la serina 93 (Fig. 29D). Como se puede observar en la figura 29E, el tratamiento con el inhibidor no afecta a los niveles totales de HP1 γ , sino sólo a los niveles de HP1 γ -S93P. La cuantificación de la intensidad de las señales de inmunofluorescencia obtenidas en este experimento indica claramente que el incremento de la señal de HP1 γ -S93P de interfase a mitosis depende de la actividad de Aurora B y que este efecto no se debe en ningún caso a un cambio en los niveles totales de HP1 γ (Fig. 29F).

3.4 Aurora B fosforila HP1 γ en la serina 93 in vitro

Los experimentos que se presentan en el apartado anterior no nos permiten distinguir entre si Aurora B fosforila directamente HP1 γ , o si la fosforilación la lleva a cabo otra quinasa cuya actividad y/o localización dependen de Aurora B. Para comprobar si Aurora B tiene la capacidad intrínseca de fosforilar HP1 γ , llevamos a cabo un ensayo quinasa. Para ello inmunoprecipitamos el complejo CPC en su forma activa a partir de extractos mitóticos de *X. laevis*, y lo incubamos con proteína recombinante GST-HP1 γ en presencia de ATP- γ -³²P (Fig. 30A). Como puede verse la quinasa Aurora B presente en el complejo CPC fosforila a HP1 γ . Por otra parte, si usamos como sustrato una versión mutante de la proteína en la que la serina 93 se sustituye por un residuo de alanina, no fosforilable, el CPC no incorpora ³²P. Estos resultados indican que Aurora B fosforila HP1 γ específicamente en la serina 93 y es por tanto probable que sea esta quinasa quien lleve a cabo la fosforilación de la proteína al comienzo de mitosis.

3.5 La fosforilación de HP1 γ en la serina 93 aumenta su afinidad por Mis12

Para entender la posible función de la fosforilación de HP1 γ en la serina 93 durante mitosis, decidimos comprobar si esta fosforilación facilita la interacción de HP1 γ con proteínas importantes para la progresión mitótica. Existen evidencias que indican que las proteínas HP1 interactúan con INCENP (componente del CPC, Ainsztein et al. 1998), con Sgo1 (proteína reguladora de la cohesión centromérica (Yamagishi et al. 2008) y con Mis12 (una proteína esencial para la formación y funcionamiento del cinetocoro, (Obuse et al. 2004).

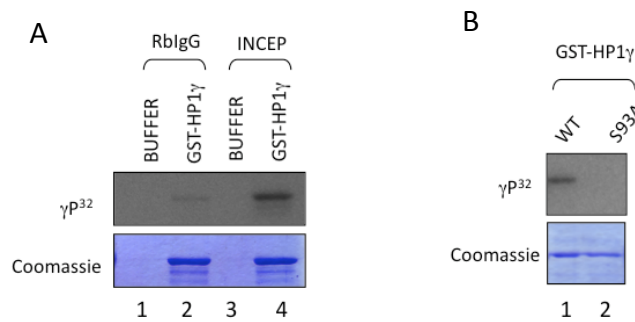


Figura 30. Aurora B fosforila in vitro a HP1γ en la serina 93. (A) Ensayo quinasa de HP1γ. Aurora B se inmunoprecipitó a partir del CPC (*Chromosome Passenger Complex*) usando un anticuerpo contra INCEP. Como control de la inmunoprecipitación se usó RbIgG. Los diferentes complejos inmunoprecipitados se combinaron con buffer (carril 1 y 3), GST-HP1γ (carril 2 y 4). (B) Ensayo quinasa pero en esta ocasión usando un mutante de HP1γ en él que se ha sustituido la serina 93 por alanina.

Efectivamente, tras incubar la proteína recombinante GST-HP1γ unida a una matriz de agarosa con un extracto de células mitóticas, en dicha matriz se detectan Aurora B (también componente del CPC), Sgo1 y Mis12 (Fig.31, carril 2). Sin embargo, si se incubaba con la proteína mutante GST-HP1γ S93A (donde se ha sustituido la serina por alanina), la interacción con Sgo1 no varía, la interacción con Aurora B disminuye ligeramente y la interacción con Mis12 prácticamente desaparece (Fig.31, carril 3). Este resultado sugiere que la fosforilación de HP1γ en la serina 93 estabiliza la interacción entre HP1γ y Mis12, al menos in vitro, y en menor medida promueve también la interacción con el CPC, al menos en las condiciones de este ensayo.

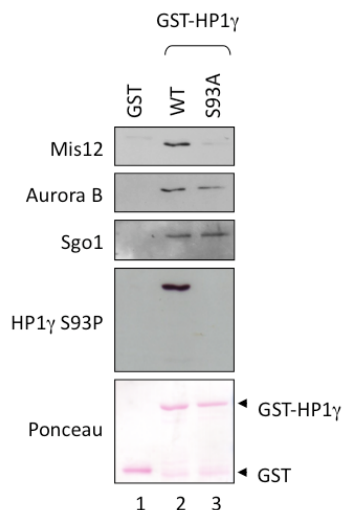


Figura 31. La fosforilación de HP1γ en la serina 93 estabiliza su interacción con Mis12 in vitro. Pull-down de extractos mitóticos de células HeLa usando proteína recombinante GST (carril 1), HP1γ *wild-type* (carril 2) y HP1γ S93A (carril 3). Posteriormente los diferentes muestras se corrieron en gel de SDS-PAGE y se transfirieron en membranas de nitrocelulosa para llevar finalmente a cabo un *western blot*.

3.6 HP1 α y HP1 β también son fosforiladas por Aurora B e interaccionan con Mis12

HP1 γ no es la única isoforma de HP1 capaz de ser fosforilada por Aurora B. Como puede observarse en la Fig. 32A, Aurora B fosforila también HP1 α y HP1 β , al menos in vitro (carriles 2 y 3). Tampoco la interacción con Mis12 es específica de HP1 γ , pues HP1 α y HP1 β son capaces retener cantidades similares de Mis12 cuando se incuban en un extracto de células mitóticas (carriles 6 y 7, Fig. 32B). Existe por tanto la posibilidad de que las tres isoformas tengan un comportamiento similar en mitosis y contribuyan a la fidelidad de la segregación cromosómica. Sin embargo, cabe recordar que, al menos en nuestros experimentos, sólo la eliminación de HP1 γ produce defectos significativos durante mitosis.

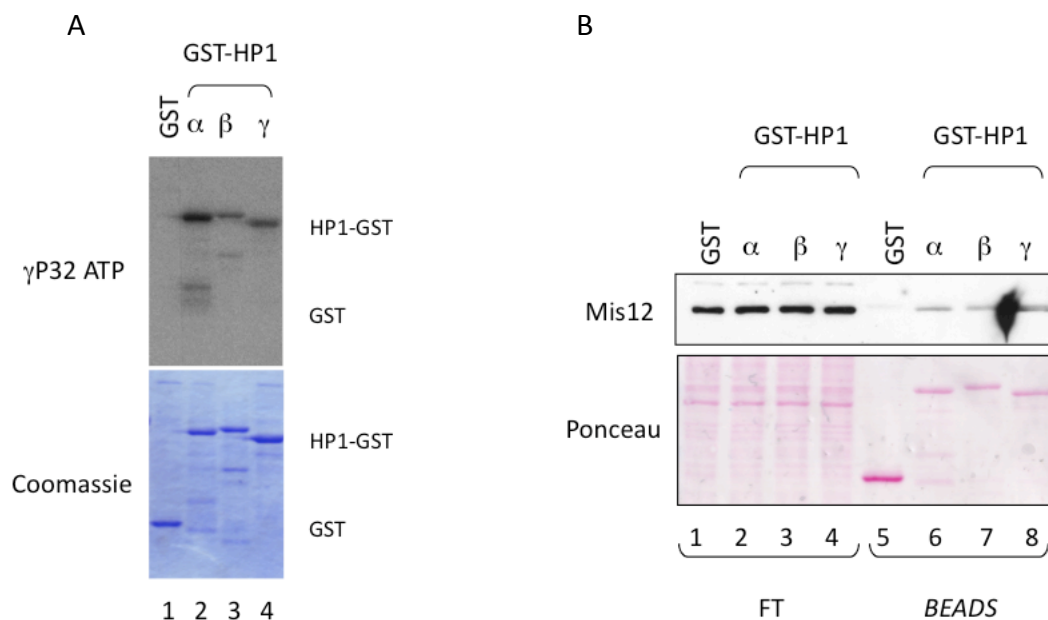


Figura 32. Todas las isoformas de HP1 son fosforiladas por Aurora B e interaccionan con Mis12 in vitro. (A) Ensayo quinasa de HP1 α , β y γ a partir de CPC inmunoprecipitado con INCEP de extractos mitóticos de huevos de *Xenopus laevis*. GST (carril 1), HP1 α (carril 2), HP1 β (carril 3) y HP1 γ (carril 4). **(B)** Pull-down Mis12 a partir de extractos mitóticos de células HeLa usando GST-HP1. GST (carril 5), HP1 α (carril 6), HP1 β (carril 7) y HP1 γ (carril 8). Posteriormente los diferentes muestras se corrieron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron en membranas de nitrocelulosa para llevar finalmente a cabo un *western blot*.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

HP1 y la regulación de la cohesión y Cohesina: Discrepancias de resultados

A partir de los estudios en *S. pombe* a cerca de la regulación de la Cohesina por Swi6/HP1, se dio por hecho que un mecanismo similar ocurría en vertebrados (Fig. 5) (White and Allshire 2004), y de esta manera se podía establecer una relación entre heterocromatina y cohesión como habíamos hablado en apartados anteriores (ver Introducción para más detalle). El comprobar esta hipótesis ha sido el objetivo principal de esta tesis. Los resultados mostrados apoyan la idea de que al eliminar HP1 del centrómero (bien mediante siRNA o alterando su unión a cromatina mediante drogas epigenéticas) no existen grandes defectos de cohesión ni tampoco problemas en la regulación de la Cohesina (Fig. 16-17 y 14 respectivamente).

Sin embargo esto plantea una contradicción muy fuerte con publicaciones anteriores de las que hemos hablado:

- Células DT-40 en las cuales se había eliminado Dicer presentaban fallos en la localización de la subunidad de la Cohesina Rad21. Lo cual esta de acuerdo con el mecanismo molecular Dicer-Swi6/HP1-Cohesina (Fukagawa et al. 2004).
- En *Drosophila* los mutantes para la metil-transferasa en H3K9 (Su(var)3-9), muestran una ligera reducción en las cantidades de Cohesina en secuencias satélites pericentroméricas (Peng and Karpen 2007).

A estos descubrimientos se han unido recientemente dos observaciones más:

- Células HeLa en las que se había eliminado HP1 α presentaban niveles reducidos de Sgo1 en el centrómero, y en consecuencia fallos de cohesión (Yamagishi et al. 2008).
- Células HeLa en donde se sobreexpresaba el dominio C-terminal de HP1 β (lo cual provocaba que el resto de las isoformas de HP1 no fueran reclutadas a heterocromatina) presentan defectos de cohesión y niveles bajos de Cohesina (Inoue et al. 2008).

Por otro lado nuestros resultado han encontrado apoyo en otra serie de publicaciones:

- MEFs *knock-out* para el factor Dicer no mostraban ningún defecto de cohesión en extensiones de cromosomas metafásicos (Kanellopoulou et al. 2005).
- Cromosomas obtenidos de larvas de *Drosophila* con niveles reducidos de HP1 no muestran defectos de cohesión centromérica (Fanti et al. 1998).
- MEFs doble *knock-out* para las histona-metil-transferasas Suv39h1 y Suv39h2, implicadas en la modificación H3K9Me, donde se une HP1, no muestran fallos en el

reclutamiento de la Cohesina (Koch et al. 2008). Este mismo grupo intento además llevar a cabo siRNA de cada una de las isoformas de HP1 pero nunca detectó ningún defecto de cohesión (resultados no publicados).

Existen varios motivos que podrían explicar estas diferencias. Así por ejemplo en los dos estudios llevados a cabo en *Drosophila*, en el primero (Peng and Karpen 2007) que apoya la vía Suv39-HP1-Cohesina, la disminución de Cohesina que los autores manifiestan es difícil de considerar: en este estudio se observó que por ChIP los niveles de Cohesina unida al satélite 1688 pasaron de ser 0.9 en el mutante de Su(var)3-9 a 0.6 en el *wild-type*, es decir una reducción de 1.5 veces en los mutantes Su(var)3-9 respecto al *wild-type*. Una diferencia considerable si no tenemos en cuenta que la desviación estándar o error para los mutantes de Su(var)3-9 fue de aproximadamente 0.6 (con una media de 0.6 de cuatro PCR de dos experimentos de ChIP). Desde nuestro punto de vista esto plantea serias dudas a cerca de la importancia de la vía Suv39-HP1 en la regulación de la Cohesina del centrómero. Estas grandes diferencias entre PCRs de diferentes experimentos pueden venir o de problemas técnicos o de que realmente la perdida de Suv39 no desestabiliza completamente la unión de Cohesina y que hay más factores que influyen en su unión al centrómero. Por supuesto el segundo artículo (Fanti et al. 1998) que no apoya la vía Suv39-HP1-Cohesina tiene también algún inconveniente, especialmente que los autores manifiestan que la reducción de HP1 no es completa. Quizás pequeñas cantidades de HP1 puedan estar aún actuando y rescatando la función.

Sin embargo este último resultado ha encontrado apoyo en los últimos experimentos llevados a cabo en MEFs doble *knock-out* para las enzimas Suv39h1 y Suv39h2 (Koch et al. 2008). En este estudio se generaron dos líneas (en el *wild-type* y en el doble *knock-out*) que expresaban la subunidad Scc1 de la Cohesina con un tag de myc. En ambas líneas la Cohesina estaba presente en extensiones de cromosomas metafásicos aún cuando no pudo detectarse señal alguna de HP1 en el centrómero.

En el caso de los dos modelos *knock out* de Dicer (Fukagawa et al. 2004; Kanellopoulou et al. 2005), en células DT40 y MEFs, la discrepancia de los resultados es más difícil de explicar. La única solución que encontramos es la diferencia de especies en los dos modelos usados. Aún así resulta difícilmente creíble que mecanismos tan básicos como son el mantenimiento de la estructura del centrómero den resultados tan distintos en diferentes especies de metazoos.

Respecto a los estudios llevados a cabo en células humanas empezaremos explicando los resultados obtenidos por Yamagishi et al. En este artículo encontraron una relación funcional entre la proteína Sgo1 de *S. pombe* y la Cohesina, y posteriormente analizaron si dicha relación estaba conservada en organismos superiores. En este caso, observaron que HP1 α interacciona con Sgo1 y que la eliminación de esta isoforma mediante siRNA provoca una deslocalización de Sgo1 total en el 10% de las mitosis y parcial en el 30%. Esta deslocalización además solo se produce cuando las células son arrestadas durante largos tiempos en nocodazol (4 horas), sin embargo cuando no se produce arresto alguno, las células no presentan ningún tipo de defecto.

Tanto nuestros resultados como los suyos están de acuerdo en las dos siguientes ideas:

- HP1 α no es necesaria para el reclutamiento de la Cohesina en las regiones de heterocromatina pericentromérica, dado que ni ellos ni nosotros observamos defectos en las mitosis en una población de células HeLa no arrestadas con colcemida o nocodazol (Fig. 16).
- HP1 α interacciona con Sgo1. En nuestro caso no pudimos detectar como ellos la interacción por inmunoprecipitación (datos no mostrados), sin embargo por experimentos por pull-down si fue evidente (Fig. 9C).

Sin embargo encontramos una contradicción clara y es que tras eliminar HP1 α y arrestar las células durante 2 horas con colcemida no pudimos observar defectos de cohesión, lo cual esperaríamos si hubiera algún defecto en el mantenimiento de Sgo1 en el centrómero.

Aunque nuestros niveles de eliminación de HP1 α eran bastante buenos (90%, Fig. 10A) y que se prolongaban a lo largo del tiempo (3 y 5 días) una posibilidad es que nuestro oligo no fuera capaz de conseguir una eliminación tan efectiva como los oligos que usaban ellos. Por ello decidimos ensayar los tres oligos al mismo tiempo y en similares condiciones a las que empleaban. Como puede verse en nuestros resultados los tres oligos eliminaron de manera similar HP1 α . Sin embargo los oligos empleados por Yamagishi et al mostraron una reducción en la proliferación de las células en cultivo que no fue observada en nuestro oligo (datos no mostrados). Respecto a la deslocalización de Sgo1 solamente las células tratadas con el oligo α -Y2 presentaron un incremento en el número de mitosis con Sgo1 deslocalizada. Una posibilidad para explicar la diferencia de resultados es que los oligos usados en sus experimentos presenten cierta toxicidad en la célula que pueda explicar el fallo de proliferación y la deslocalización de Sgo1 (en el caso del oligo α -Y2). En este sentido nuestro estudio tiene de positivo que usamos *stealth* siRNA de la compañía Invitrogen que han

mostrado ser menos tóxicos que los oligos convencionales de 21 nucleótidos. Por otro lado tampoco podemos obviar el hecho de que sus oligos puedan haber eliminado mejor HP1 α y por eso obtengan resultados. En este sentido en nuestro estudio nos preocupamos en intentar observar si tras eliminar HP1 α eliminábamos específicamente la población centromérica, que es en principio la que está llevando a cabo la función de mantenimiento de Sgo1 durante mitosis. Sin embargo no fuimos capaces de detectar por inmunofluorescencia señal centromérica de HP1 α tras tratar con el siRNA (Fig. 12).

Recientemente ha aparecido otra publicación (De Koning et al. 2009) donde también manifiestan que la eliminación de HP1 α provoca defectos en mitosis. Sin embargo estos datos no suponen una novedad con respecto a lo que se ha hecho hasta ahora dado que los oligos usados son los mismos que usaron Yamagishi y colaboradores.

Por otro lado Inoue y colaboradores utilizaron células HeLa que sobreexpresaban el dominio C-terminal de HP1 β (*chromoshadow*) para eliminar todas las isoformas de HP1 unidas a cromatina. Este ensayo se basaba en el hecho de que estas proteínas dimerizan a través del dominio *chromoshadow* entre ellas, y esta unión es requisito indispensable para poder enlazar a cromatina. No obstante si se expresa un mutante de HP1 con solamente el dominio *chromoshadow* la unión a cromatina falla debido a que una de las subunidades del dímero es incapaz de unirse a cromatina porque le falta el *chromodomain* o cromodominio (Zhang et al. 2007b). En estas circunstancias las células que sobreexpresaban dicha construcción mostraban un descenso en los niveles de Cohesina en el centrómero y por tanto separación prematura de cromátidas hermanas. Sin embargo resulta difícil valorar el descenso de Cohesina en el centrómero dado que ellos no preextraían las células y por tanto no distinguen bien entre la población de Cohesina del citosol y la del centrómero. Curiosamente si sobreexpresaban HP1 α entera también obtenían los mismos defectos de cohesión y disminución de Cohesina centromérica.

Este último hecho nos permite proponer un modelo que pudiera estar en consonancia con nuestros resultados. Como hemos dicho mediante la expresión de la construcción C-terminal de HP1 β se consigue eliminar gran parte (80% para algunos autores, (Zhang et al. 2007b) de HP1 unida a cromatina, no obstante es imposible de esta manera distinguir las contribuciones individuales de cada una de las isoformas de HP1 en los defectos observados. En este sentido tanto ellos como nosotros observamos defectos en la condensación y la cohesión de los cromosomas (en nuestro caso solo cuando eliminamos HP1 γ). Una posibilidad es que los defectos que observan sean consecuencia de una disminución de HP1 γ en cromatina porque la sobreexpresión del dominio C-terminal de HP1 β impide su unión. Si

DISCUSIÓN

realmente HP1 γ es tan importante para la función centromérica podría ser que la sobreexpresión de HP1 α disminuya la cantidad de dímeros útiles que presentan HP1 γ , disminuyendo por tanto la proporción de esta isoforma en cromatina y provocando defectos en mitosis aún cuando estamos expresando HP1 α *wild-type* (figura 33). Además esta promiscuidad de las HP1s a la hora de formar diferentes dímeros según diferentes condiciones ha quedado puesta de manifiesto en los experimentos de siRNA de HP1 γ : donde la eliminación de esta isoforma aumentaba los niveles en cromatina de las otras dos (figura 11).

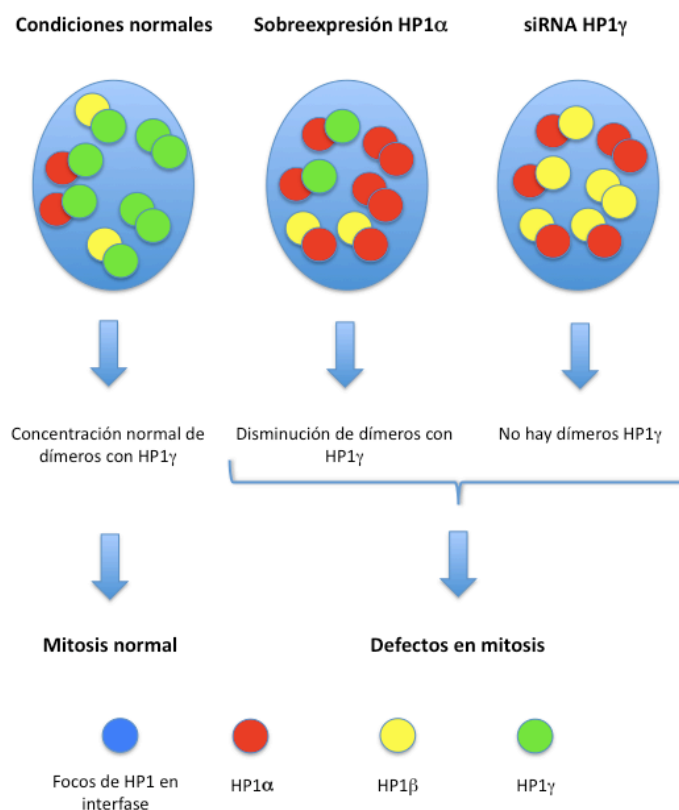


Figura 33. La eliminación de los dímeros de HP1 γ en la heterocromatina pericentromérica conduce a defectos en mitosis. En condiciones normales la célula presenta una concentración de dímeros con HP1 γ determinada, la cual es necesaria para una correcta progresión en mitosis. Si sobreexpresa HP1 α se disminuye la proporción de dímeros con HP1 γ en cromatina lo cual conduce a defectos en mitosis. Condiciones similares nos encontramos al eliminar HP1 γ mediante siRNA.

No obstante este modelo tiene un problema y es que la mayoría de los defectos que Inoue y colaboradores observan son separaciones prematuras de las cromátidas hermanas, mientras que nosotros lo que observamos mayormente es una disminución en la cohesión centromérica con deslocalización de Aurora B, aunque las cromátidas siguen permaneciendo juntas y en menor proporción mitosis con separación prematura de cromátidas hermanas. Las diferencias encontradas podrían quizás deberse al sistema o técnicas usadas (siRNA vs. sobreexpresión).

Para llegar a un entendimiento más profundo de la biología de HP1 en cromosomas de mamíferos y resolver las discrepancias que observamos será necesario acudir a la generación de modelos *knock-out* completos o condicionales de cada una de las isoformas. En este sentido ya se han dado los primeros pasos. Así por ejemplo el ratón *knock-out* (KO) para la isoforma de HP1 β ha sido generado (Aucott et al. 2008). Dicho modelo muere nada mas nacer debido a una insuficiencia respiratoria como consecuencia de defectos en la generación de las uniones neuromusculares. Estos autores además mostraron que las neuroesferas exhibían inestabilidad genómica que se manifestaba en un incremento de separación prematura de cromátidas hermanas, micronúcleos y diplocromosomas (es decir cromosomas unidos a nivel del centrómero). El fenotipo de separación prematura de cromátidas hermanas puede estar en consonancia con un fallo en el reclutamiento/mantenimiento de la Cohesina en el centrómero, sin embargo el hecho de que aparezcan diplocromosomas nos lleva a pensar que el proceso en el que está implicado HP1 β es más complejo que simplemente una relación directa entre HP1 β y Sgo1 o Cohesina. Por otra parte tampoco podemos obviar el hecho de que los defectos observados se puedan deber a un problema en la regulación de la transcripción más que en un defecto en la estructura de la heterocromatina pericentromérica.

HP1 γ conduce a defectos en mitosis

Respecto a nuestros resultados la única isoforma que al ser eliminada provocó algún defecto fue HP1 γ . No es la primera vez que esta isoforma se ve relacionada con la regulación de la mitosis. Así Obuse y colaboradores al eliminar conjuntamente HP1 α y HP1 γ observaron una deslocalización en la proteína del cinetocoro Mis12. Una posibilidad es que nuestra eliminación sea tan efectiva que provoque la pérdida de Mis12 únicamente eliminado HP1 γ , sin embargo esta opción tiene que ser testada todavía en el laboratorio.

Por otro lado los defectos observados recuerdan a un defecto obtenido por eliminación de Cohesina (Losada et al. 2005), sin embargo no hemos podido observar un fallo en dicho reclutamiento aún cuando aumenta la frecuencia de cromosomas con un ligera disminución o pérdida total de la cohesión centromérica (fenotipo 1 y 2 de la figura 14 respectivamente). La sobrecondensación cromosómica observada en estos cromosomas puede deberse a que las células han permanecido mucho tiempo en mitosis. Esto es lógico dado que también aumentó el número de células con cromosomas mal alienados (fenotipo 5), lo cual indica que la células tardan más tiempo en generar una placa metafásica. Por otro lado el fenotipo de pérdida total de cohesión (fenotipo 2) no tiene porque ser debido a un fallo en

el reclutamiento de Cohesina. Puede ser que estas mitosis que llevan tanto tiempo intentando alinear correctamente los cromosomas finalmente entren en anafase, pero de manera incorrecta separando las cromátidas de manera desorganizada y generando el fenotipo 2 o un estadio intermedio que podría ser el 1. Estas anafases aberrantes también han sido observadas y es lo que denominábamos pseudoanafases.

Desde otro punto de vista los defectos que vemos no tendrían que ser única y exclusivamente debidos a un problema en la estructura de la heterocromatina pericentromérica o la formación del cinetocoro, dado que HP1 γ es también un factor de transcripción. Podría ser que factores importantes de mitosis pudieran alterar su regulación como consecuencia de la pérdida de este factor. En este sentido ya se ha observado en *Drosophila* que la pérdida de HP1 conlleva una variación en varios genes cuyas proteínas están implicadas en mitosis (De Lucia et al. 2005).

Me gustaría también indicar que los defectos que hemos observados tras eliminar HP1 γ presentan una serie de inconvenientes:

- Solamente hemos podido obtener defectos significativos, tras 5 días después de la primera transfección. Este es un tiempo demasiado largo, y que algunos científicos consideran peligroso porque puede aumentar la probabilidad de generar *off-target* o lo que es lo mismo generar defectos que son inespecíficos al factor que queremos eliminar.
- No hemos reproducido los defectos observados con otro siRNA para HP1 γ . Bien es cierto que hemos probado en diversas ocasiones dos oligos más (también *stealth*), pero sin embargo no llegamos a eliminar el 90% de la proteína, solamente un 70 u 80%. También hay que destacar que cuando la eficiencia de la eliminación con el oligo usado en esta tesis fue entorno al 70 u 80% tampoco conseguimos ver grandes defectos. Para resolver este dilema será necesario generar una proteína recombinante en la cual el mRNA este mutado en el sitio que reconoce el siRNA usado hasta ahora, para así poder asegurarnos la especificidad de dicho siRNA.
- Los MEFs KO para HP1 α y HP1 β no pueden reclutar HP1 γ a las regiones de heterocromatina pericentromérica en interfase (Dialynas et al. 2007). Esto plantea una contradicción: ¿por qué al eliminar HP1 γ si obtenemos defectos y al eliminar HP1 α o β no vemos nada si la unión de HP1 γ a la heterocromatina pericentromérica se está viendo afectada? Una posibilidad es que el eliminar individualmente HP1 α o β la otra isoforma (β o α) este supliendo la función. Sería interesante en este caso comprobar que al eliminar conjuntamente ambas proteínas obtenemos defectos similares a los

generados al eliminar solamente HP1 γ . En este sentido llevamos a cabo una eliminación doble de HP1 α y β y estudiamos solamente en ese momento el fenotipo 2 (perdida total de cohesión) tras 3 y 5 días de la primera transfección y fuimos incapaces de observar diferencias respecto al control (datos no mostrados). Queda por contestar si el resto de fenotipos también se vio afectado. Por otro lado los autores que describieron esta dependencia de HP1 γ para unirse a las regiones de heterocromatina pericentromérica solo lo hicieron en células interfásicas, cabe cuestionarse si realmente esto se cumple en mitosis (podría ser que la unión de HP1 γ durante mitosis no dependiera solo de H3K9Me como se ha mostrado como HP1 α (Hayakawa et al. 2003).

- De Koning y colaboradores (De Koning et al. 2009) mostraron que un siRNA contra HP1 γ no producía ningún defecto en mitosis. Evidentemente nos encontramos con el mismo problema que el caso del artículo de Yamagishi y colaboradores respecto a HP1 α y Sgo1. Será necesario comparar ambos oligos antes de llegar a una conclusión definitiva a cerca de cual da un resultado más veraz o una eliminación mejor.

Por último parece que la eliminación de las tres isoformas de HP1 no conduce a mayores defectos que los obtenidos al eliminar solo HP1 γ . E incluso para observar defectos en las células tratadas con el siRNA de HP1 γ tuvimos que esperar 5 días después de la primera transfección. Una posibilidad es que la eliminación por si sola de HP1 no sea suficiente para alterar la estructura de la heterocromatina pericentromérica. Una evidencia de esto lo reflejan los experimentos donde se sobreexpresa el dominio *chromoshadow* de las isoformas de HP1 α o HP1 β (Mateos-Langerak et al. 2007). En estos experimentos llevados a cabo en células 3T3 la sobreexpresión de estos dominios conduce a una pérdida en la acumulación de HP1 α , HP1 β y HP1 γ en la heterocromatina pericentromérica. Sin embargo esto no afectó a la estructura de los dominios de heterocromatina pericentromérica en interfase (representados por focos en el núcleo teñidos con DAPI o marcados mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-H3K9Me).

Tratamientos farmacológicos con drogas que alteran el estado de la cromatina

Una forma alternativa de estudiar el papel de la heterocromatina pericentromérica en la regulación de la Cohesina es mediante el tratamiento con drogas como el TSA o el AZA que modifican el estado epigenético de la cromatina. Los tratamientos que mostramos en esta tesis modificaron sustancialmente los niveles de acetilación (en el caso del TSA y el AZA, Fig.

19) y de metilación (en el caso del AZA, Fig. 19). Además observamos una serie de fenotipos que ya habían sido descritos en células tratadas con dichas drogas: defectos en mitosis (Taddei et al. 2001; Nieto et al. 2004), presencia de núcleos grandes (Bartova et al. 2005) o relocalizaciones del cinetocoro (Taddei et al. 2001). Pero más importante para este estudio es el aumento en la frecuencia de células interfásicas donde HP1 se presentaba deslocalizada (Fig. 20).

De esta forma estos tratamientos tan agresivos (ya que no solo alteran la unión de HP1 al centrómero, sino que modifica sustancialmente el estado epigenético de la cromatina) eran bastante útiles para estudiar si de alguna manera la unión de Cohesina al centrómero o a la cromatina se veía disminuida. No obstante hemos sido incapaces de observar dicho efecto (Fig. 23), lo cual corrobora los resultados obtenidos en los experimentos de siRNA contra las isoformas de HP1.

En el caso de AZA se había observado que tras tratar células con esta droga no se disminuía la cantidad de Cohesina en las secuencias Alu sino todo lo contrario, aumentaba mediante análisis por ChIP (Hakimi et al. 2002). Este resultado está acorde con los nuestros pues tampoco hemos observado disminución y sí un ligero aumento del número de células Scc1-Myc⁺ al tratar con AZA (figura 23).

Por último otros autores (Zeng et al. 2009) no han visto una reducción en la unión de HP1 a cromatina al tratar con AZA. Las diferencias pueden deberse a que las secuencias que ellos analizaron no son de heterocromatina pericentromérica (eran repeticiones D4Z4 del brazo corto del cromosoma 4) y además utilizaron una concentración de AZA de 50 μ M durante 24 horas, la cual tampoco en nuestras manos produce una deslocalización de HP1 de la heterocromatina pericentromérica (datos no mostrados), la concentración que nosotros usamos es de 1 μ M durante un tiempo de 5 días.

La fosforilación de HP1 y durante mitosis

Recientemente se ha visto que las isoformas de HP1 humanas son extensamente modificadas con fosforilaciones, sumoilaciones, metilaciones... (Leroy et al. 2009). Se desconoce el efecto de la mayoría de estas modificaciones y la función que tienen en los procesos celulares. No obstante a nivel de las fosforilaciones se han descrito diferentes papeles:

- En *D. melanogaster* se ha visto que la aparición de la forma hiperfosforilada de HP1 α coincide con el momento embrionario en que la heterocromatina se hace citológicamente visible (Eissenberg et al. 1994).
- Un estudio realizado también en *Drosophila* (Shareef et al. 2001) mostró que las formas hipofosforiladas interaccionaban preferentemente con los factores ORC (*Origin Recognition Complex*) y HOAP (*HP1/ORC-Associated Protein*).
- HP1 γ necesita ser fosforilada en la serina 93 para ser reclutada a los SAHF en células WI38 (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*) (Zhang et al. 2007a).
- La misma fosforilación en la serina 93 en células HeLa es una marca de cromatina transcrita activamente (Lomberg et al. 2006a).
- La fosforilación de HP1 β en la serina 53 en células HeLa es necesaria para que sea liberada de las regiones de heterocromatina y así pueda iniciarse la respuesta al daño (Ayoub et al. 2008).

Por otra parte hace ya tiempo se mostró que HP1 α y γ son modificadas durante mitosis aunque se desconocía que tipo de modificación estaba implicada (Minc et al. 1999)

En este trabajo lo que hemos mostrado es que al menos HP1 γ es fosforilada in vivo en la serina 93 durante mitosis por un mecanismo dependiente de Aurora B (Fig. 29), que in vitro esta misma quinasa es capaz de fosforilar este mismo residuo y que la mutación de dicho residuo (S93A) decrece considerablemente el nivel de fosforilación de HP1 γ (Fig. 30). Además hemos propuesto una posible función en mitosis, dado que al menos in vitro la fosforilación en la serina 93 promueve claramente la interacción entre HP1 γ y Mis12, siendo alterada cuando mutamos el residuo a alanina (Fig. 31). Este resultado tendría sentido además con lo obtenido en los experimentos de ARNi: la eliminación mediante siRNA de HP1 γ eliminaría la posibilidad de que ésta fuera fosforilada y por tanto que Mis12 fuera reclutada al centrómero y de ahí los defectos que observamos. Un modelo de esta idea se presenta en la figura 34.

Sin embargo existen una serie de inconvenientes o problemas que hay que soslayar:

- Hasta ahora lo único demostrado es que HP1 α y γ son ambas requeridas para el reclutamiento de Mis12 y la eliminación individual de cualquiera de ellas no afecta a dicho reclutamiento (Obuse et al. 2004).
- Dado que solo hemos obtenido defectos al eliminar HP1 γ y no HP1 α o β , parece que el mecanismo que hemos enseñado es único para HP1 γ y no para las otras dos isoformas. No obstante también hemos mostrado que HP1 α y β , pueden ser fosforiladas por Aurora B in vitro y que pueden unirse a Mis12 también in vitro.

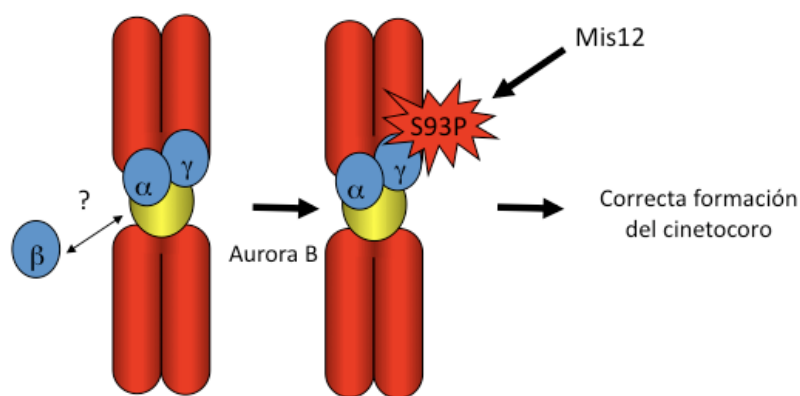


Figura 34. Mecanismo de acción de HP1γ durante mitosis. HP1α y γ se encuentran en el centrómero, todavía no existen evidencias de que HP1β también se una al centrómero en mitosis. HP1γ sería fosforilada por Aurora B y esto facilitaría la unión de Mis12 y una correcta formación del cinetocoro.

Por otro lado la importancia de la fosforilación en la S93 en la interacción con Aurora B todavía es difícil de considerar dado que observamos una ligera disminución en el caso del mutante S93A respecto al *wild-type* (Fig. 31). Quizás si en el futuro probamos otras proteínas del CPC como INCENP las diferencias sean más notables.

Otras posibles funciones en mitosis para la fosforilación de HP1 vienen sugeridas también de estudios llevados a cabo en *Drosophila* (Badugu et al. 2005). En esta ocasión los autores mutaron 9 residuos de HP1a situados en la región *hinge*. La mutación de estas serinas y treoninas a glutámico (simulando así una forma hiperfosforilada) aumentaba la capacidad de la proteína de homodimerizar y de unirse más fuertemente a la H3K9me. Entre los residuos modificados se encontraba la serina 113 (S113) homóloga a la serina 92 (S92) de HP1α humana y a la S93 de HP1γ (figura 35, estas tres serinas alinean perfectamente solo cuando quitamos del alineamiento HP1β, ver Fig. 4). Además tanto la serina 92 como la 113 de HP1α y HP1a respectivamente, se encuentran en secuencias consenso similares a las que reconoce Aurora B. Una posibilidad es que la fosforilación refuerce la unión de HP1γ al centrómero (porque aumenta la unión de HP1 con H3K9Me) lo cual evite que sea expulsada de cromatina durante mitosis por la fosforilación de serina 10 en la histona H3. Además es interesante indicar que en el caso de HP1β no pudimos observar ninguna secuencia consenso, ni siquiera similar, para la fosforilación por Aurora B. Esto abre la posibilidad de que HP1α (porque también tiene la serina) y HP1γ sean fosforiladas y se mantengan en los centrómeros (figura 7) durante mitosis y HP1β no, porque no puede ser fosforilada.

Sin embargo lo más probable es que existen otros mecanismos necesarios para el mantenimiento de HP1α y HP1γ en el centrómero dado que al menos por inmunofluorescencia

```

HP1α, -----MGKTKRTADSS---SSEDEEEYVVEKVLDRRVVKGQVEYLLKWKGFSE 46
HP1γ MASNKTTLQMGKKQNGSKKV---EEAPEEFVVEKVLDRRVVNGKVEYFLKWKGFSD 56
HP1α -----MGKIDNPSSAKVSDAEEEEEYAVEKIIDRRVKGKVEYLLKWKGYE 50
      ****      . . . . . : *: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
HP1α, EHNTWEPEKNLDCPELISEFMKKYK-----KMKEGENNKPRESSESNK 89
HP1γ ADNTWEPEENLDCPELIAEPLNSQK-----AGKE-----KDGTK 90
HP1α TENTWEPENNLDCQDLIQQEASRKDEEKSAAKKDRPSSAKAKETQGRASSSTSTAK 110
      *****:****:****: : : * * * * *
HP1α, RKSFNFSNADDIKSKKKKREQSNDIA----RGFERGLEPEKIIIGATDSCGDLMLMKWKD 144
HP1γ RKSISDSSESDDSKSKKKRD-AADKP----RGFARGLDPERIIIGATDSSGELMFLMKWKD 144
HP1α RKSEPTAPSGNKSRTTDAEQDITPVSGSTGDFDRGLEAEKILGASDNNGRLLFTLIQFKG 170
      * . . . . * *: : * * * * *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
HP1α, TDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYEEERLTWHAYPEDAENKEKETAKS 191
HP1γ SDEADLVLAKEANMKCPQIVIAFYEEERLTWHSCPEDEAQ-----183
HP1α VDQAEEMPVSSVANEKI PRMVFHFYEEERLSWYSDNED-----206
      *.***. . . * * *.***.*****.***.

```

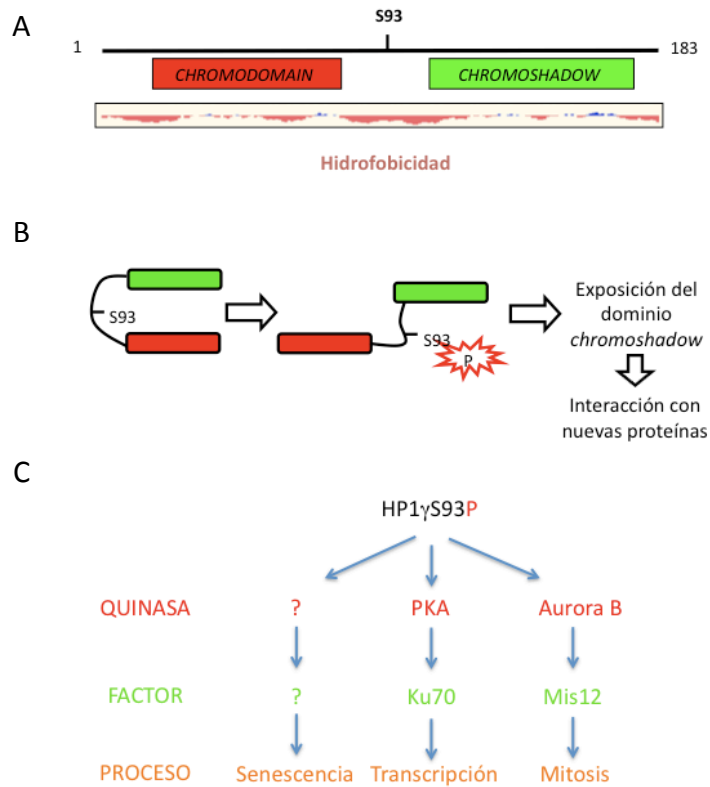


Figura 36. Modelo funcional de la fosforilación de HP1γ en la S93. (A) Mapa de la hidrofobicidad de HP1γ, en rojo aparece el cromodominio y en verde el dominio *chromoshadow*, entre ellos se encuentra la región *hinge* o de bisagra que es donde se localiza la S93. Debajo de este esquema se representa la hidrofobicidad relativa de cada una de las regiones de HP1γ, siendo la región *hinge* la más hidrofóbica respecto al cromodominio y al dominio *chromoshadow*. (B) HP1γ al ser fosforilada en la S93 provoca un cambio conformacional de la proteína y el dominio *chromoshadow* queda expuesto o libre para poder interactuar con distintas proteínas. (C) Importancia de la fosforilación de la S93 de HP1γ en diferentes procesos celulares (naranja) indicando la quinasa implicada en la fosforilación (rojo) y el factor con el que interactúa (verde).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La eliminación de HP1 γ promueve el reclutamiento de HP1 α o HP1 β a cromatina.
2. La eliminación individual de HP1 α o HP1 β o HP1 γ no conduce a fallos en el reclutamiento de Cohesina a cromatina en células asincrónicas. Así mismo la eliminación de HP1 α o HP1 γ o HP1 α - γ no conduce a fallos en el reclutamiento de Cohesina al centrómero durante mitosis.
3. La eliminación de HP1 α no conduce a fallos en la localización de Sgo1.
4. La eliminación individual de HP1 γ conduce a defectos en mitosis. No así la eliminación individual de HP1 α o HP1 β . Por otro lado la eliminación de HP1 α , HP1 β y HP1 γ al mismo tiempo conduce a una frecuencia de defectos en mitosis similar a la observada en la eliminación individual de HP1 γ .
5. Los tratamiento con drogas (TSA y AZA) que alteran el estado epigenético de la cromatina y la unión de HP1 a la cromatina no afectan a la unión de Cohesina al cromosoma.
6. HP1 α , HP1 β y HP1 γ son fosforiladas in vitro por Aurora B.
7. HP1 γ se fosforila en la serina 93 durante mitosis por Aurora B (o un mecanismo dependiente de esta quinasa).
8. HP1 α , HP1 β y HP1 γ interaccionan con Mis12 in vitro.
9. La fosforilación en la serina 93 de HP1 γ estabiliza su interacción con Mis12 in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B. et al. 1999. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J* 18(7): 1923-1938.
- Ainsztein, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Mackay, A.M., Earnshaw, W.C. 1998. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol.*143(7):1763- 1774.
- Allshire, R.C. and Karpen, G.H. 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 9(12): 923-937.
- Amor, D.J., Bentley, K., Ryan, J., Perry, J., Wong, L., Slater, H., and Choo, K.H. 2004. Human centromere repositioning "in progress". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6542-6547.
- Anderson, D.E., Losada, A., Erickson, H.P., and Hirano, T. 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* 156(3): 419-424.
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C.H., Mechtler, K., and Nasmyth, K. 2003. ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol* 13(22): 1941-1953.
- Aucott, R., Bullwinkel, J., Yu, Y., Shi, W., Billur, M., Brown, J.P., Menzel, U., Kioussis, D., Wang, G., Reisert, I. et al. 2008. HP1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions. *J Cell Biol* 183(4): 597-606.
- Auth, T., Kunkel, E., and Grummt, F. 2006. Interaction between HP1alpha and replication proteins in mammalian cells. *Exp Cell Res* 312(17): 3349-3359.
- Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D., Bernal, J.A., and Venkitaraman, A.R. 2008. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453(7195): 682-686.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B., Kellum, R. 2005. Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma*. 113(7):370-384.
- Bailis, J.M., Bernard, P., Antonelli, R., Allshire, R.C., and Forsburg, S.L. 2003. Hsk1-Dfp1 is required for heterochromatin-mediated cohesion at centromeres. *Nat Cell Biol* 5(12): 1111-1116.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410(6824): 120-124.
- Bartova, E., Pachernik, J., Harnicarova, A., Kovarik, A., Kovarikova, M., Hofmanova, J., Skalnikova, M., Kozubek, M., and Kozubek, S. 2005. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci* 118(Pt 21): 5035-5046.
- Baumann, C., Korner, R., Hofmann, K., and Nigg, E.A. 2007. PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* 128(1): 101-114.

- Ben-Shahar, T.R., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., and Uhlmann, F. 2008. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321(5888): 563-566.
- Bernad, R., Sanchez, P., and Losada, A. 2009. Epigenetic specification of centromeres by CENP-A. *Exp Cell Res* 315(19): 3233-3241.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P., and Allshire, R.C. 2001. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294(5551): 2539-2542.
- Bernard, P., Schmidt, C.K., Vaur, S., Dheur, S., Drogat, J., Genier, S., Ekwall, K., Uhlmann, F., and Javerzat, J.P. 2008. Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *Embo J* 27(1): 111-121.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., Jr., and Cleveland, D.W. 2004. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 430(6999): 578-582.
- Blat, Y. and Kleckner, N. 1999. Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell* 98(2): 249-259.
- Blower, M.D. and Karpen, G.H. 2001. The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* 3(8): 730-739.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science* 151(709): 417-425.
- Canudas, S. and Smith, S. 2009. Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J Cell Biol* 187(2): 165-173.
- Chang, C.R., Wu, C.S., Hom, Y., and Gartenberg, M.R. 2005. Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. *Genes Dev* 19(24): 3031-3042.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., and Misteli, T. 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299(5607): 721-725.
- Clarke, D.J., Johnson, R.T., and Downes, C.S. 1993. Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *J Cell Sci* 105 (Pt 2): 563-569.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112(4): 407-421.
- Corpet, A. and Almouzni, G. 2009. A histone code for the DNA damage response in mammalian cells? *EMBO J* 28(13): 1828-1830.
- Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M. 2006. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* 11(5): 741-750.
- Darwiche, N., Freeman, L.A., and Strunnikov, A. 1999. Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* 233(1-2): 39-47.
- De Koning, L., Savignoni, A., Boumendil, C., Rehman, H., Asselain, B., Sastre-Garau, X., Almouzni, G. 2009. Heterochromatin protein 1: a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology. *EMBO Mol Med* 1(3): 178-191.
- De Lucia, F., Ni, J.Q., Vaillant, C., Sun, F.L. 2005. HP1 modulates the transcription of cell-cycle regulators in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 33(9):2852-2858.

- Dialynas, G.K., Terjung, S., Brown, J.P., Aucott, R.L., Baron-Luhr, B., Singh, P.B., and Georgatos, S.D. 2007. Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci* 120(Pt 19): 3415-3424.
- Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., Azuma, Y., Guacci, V., Gimenez-Martin, G., Lanier, L.M., and Clarke, D.J. 2006. PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS ONE* 1: e53.
- Diaz-Martinez, L.A., Gimenez-Abian, J.F., and Clarke, D.J. 2008. Chromosome cohesion - rings, knots, orcs and fellowship. *J Cell Sci* 121(Pt 13): 2107-2114.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 161(2): 267-280.
- Eckert, C.A., Gravidahl, D.J., and Megee, P.C. 2007. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. *Genes Dev* 21(3): 278-291.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V., and Elgin, S.C. 1990. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9923-9927.
- Eissenberg, J.C., Ge, Y.W., Hartnett, T. 1994. Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem* 269(33):21315-21321
- Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Watanabe, Y., Magnaghi-Jaulin, L., and Jaulin, C. 2008. Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 22(19): 2639-2644.
- Espada, J., Ballestar, E., Fraga, M.F., Villar-Garea, A., Juarranz, A., Stockert, J.C., Robertson, K.D., Fuks, F., and Esteller, M. 2004. Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* 279(35): 37175-37184.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. 1998. The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* 2(5): 527-538.
- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438(7071): 1116-1122.
- Fukagawa, T., Mikami, Y., Nishihashi, A., Regnier, V., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Sugata, N., Todokoro, K., Brown, W., and Ikemura, T. 2001. CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells. *Embo J* 20(16): 4603-4617.
- Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. 2004. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 6(8): 784-791.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., and Kouzarides, T. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31(9): 2305-2312.

- Gadde, S. and Heald, R. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol* 14(18): R797-805.
- Gandhi, R., Gillespie, P.J., and Hirano, T. 2006. Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol* 16(24): 2406-2417.
- Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J.M., and Ellenberg, J. 2006. Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol* 16(15): 1571-1578.
- Gillespie, P.J. and Hirano, T. 2004. Scc2 couples replication licensing to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* 14(17): 1598-1603.
- Gimenez-Abian, J.F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.M. 2004. Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol* 14(13): 1187-1193.
- Glynn, E.F., Megee, P.C., Yu, H.G., Mistrot, C., Unal, E., Koshland, D.E., DeRisi, J.L., and Gerton, J.L. 2004. Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* 2(9): E259.
- Grewal, S.I. and Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8(1): 35-46.
- Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K., and Nasmyth, K. 2006. Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* 127(3): 523-537.
- Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. 2003. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112(6): 765-777.
- Guacci, V., Koshland, D., Strunnikov, A. 1997. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 91(1):47-57
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., and Almouzni, G. 2004. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 166(4): 493-505.
- Hadjur, S., Williams, L.M., Ryan, N.K., Cobb, B.S., Sexton, T., Fraser, P., Fisher, A.G., and Merckenschlager, M. 2009. Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. *Nature* 460(7253): 410-413.
- Haering, C.H., Farcas, A.M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. 2008. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454(7202): 297-301.
- Haering, C.H., Lowe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* 9(4): 773-788.
- Haering, C.H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K., and Lowe, J. 2004. Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell* 15(6): 951-964.
- Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., Grewal, S.I. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 297 (5590): 2232-2237.
- Hakimi, M.A., Bochar, D.A., Schmiesing, J.A., Dong, Y., Barak, O.G., Speicher, D.W., Yokomori, K., and Shiekhhattar, R. 2002. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* 418(6901): 994-998.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C.M., Mechtler, K., and Peters, J.M. 2005. Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* 3(3): e69.

BIBLIOGRAFÍA

- Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H., and Hiraoka, Y. 2003. Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci* 116(Pt 16): 3327-3338.
- Henikoff, S. 2000. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* 1470(1): O1-8.
- Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(5): 311-322.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H., and Peters, J.M. 2005. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438(7071): 1176-1180.
- Hou, F., Chu, C.W., Kong, X., Yokomori, K., and Zou, H. 2007. The acetyltransferase activity of San stabilizes the mitotic cohesin at the centromeres in a shugoshin-independent manner. *J Cell Biol* 177(4): 587-597.
- Hou, F. and Zou, H. 2005. Two human orthologues of Eco1/Ctf7 acetyltransferases are both required for proper sister-chromatid cohesion. *Mol Biol Cell* 16(8): 3908-3918.
- Huang, C.E., Milutinovich, M., and Koshland, D. 2005. Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1455): 537-542.
- Huang, H., Feng, J., Famulski, J., Rattner, J.B., Liu, S.T., Kao, G.D., Muschel, R., Chan, G.K., and Yen, T.J. 2007. Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol* 177(3): 413-424.
- Inoue, A., Hyle, J., Lechner, M.S., and Lahti, J.M. 2008. Perturbation of HP1 localization and chromatin binding ability causes defects in sister-chromatid cohesion. *Mutat Res* 657(1): 48-55.
- Ivanov, D. and Nasmyth, K. 2005. A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* 122(6): 849-860.
- James, T.C. and Elgin, S.C. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 6(11): 3862-3872.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* 293(5532): 1074-1080.
- Jones, D.O., Cowell, I.G., and Singh, P.B. 2000. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* 22(2): 124-137.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19(4): 489-501.
- Kitajima, T.S., Hauf, S., Ohsugi, M., Yamamoto, T., and Watanabe, Y. 2005. Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol* 15(4): 353-359.
- Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. 2006. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441(7089): 46-52.
- Koch, B., Kueng, S., Ruckebauer, C., Wendt, K.S., and Peters, J.M. 2008. The Suv39h-HP1 histone methylation pathway is dispensable for enrichment and protection of cohesin at centromeres in mammalian cells. *Chromosoma* 117(2): 199-210.

- Kogut, I., Wang, J., Guacci, V., Mistry, R.K., and Megee, P.C. 2009. The Scc2/Scc4 cohesin loader determines the distribution of cohesin on budding yeast chromosomes. *Genes Dev* 23(19): 2345-2357.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.M. 2006. Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127(5): 955-967.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410(6824): 116-120.
- Laloraya, S., Guacci, V., and Koshland, D. 2000. Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J Cell Biol* 151(5): 1047-1056.
- Lam, A.L., Boivin, C.D., Bonney, C.F., Rudd, M.K., and Sullivan, B.A. 2006. Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4186-4191.
- Lechner, M.S., Schultz, D.C., Negorev, D., Maul, G.G., and Rauscher, F.J., 3rd. 2005. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun* 331(4): 929-937.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A.H. 2003 Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13(14):1192-1200
- Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., and Uhlmann, F. 2004. Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* 430(6999): 573-578.
- Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K.P., Shirahige, K., and Uhlmann, F. 2006. Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* 23(6): 787-799.
- Leroy, G., Weston, J.T., Zee, B.M., Young, N.L., Plazas-Mayorca, M.D., and Garcia, B.A. 2009. Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics*.
- Llano, E., Gomez, R., Gutierrez-Caballero, C., Herran, Y., Sanchez-Martin, M., Vazquez-Quinones, L., Hernandez, T., de Alava, E., Cuadrado, A., Barbero, J.L. et al. 2008. Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev* 22(17): 2400-2413.
- Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M.E., and Urrutia, R. 2006a. Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* 8(4): 407-415.
- Lomberk, G., Wallrath, L., and Urrutia, R. 2006b. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol* 7(7): 228.
- Losada, A. 2007. Cohesin regulation: fashionable ways to wear a ring. *Chromosoma* 116(4): 321-329.
- . 2008. The regulation of sister chromatid cohesion. *Biochim Biophys Acta* 1786(1): 41-48.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. 1998. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 12(13): 1986-1997.

- . 2002. Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* 16(23): 3004-3016.
- Losada, A. and Hirano, T. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* 19(11): 1269-1287.
- Losada, A., Yokochi, T., and Hirano, T. 2005. Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 118(Pt 10): 2133-2141.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., and Hirano, T. 2000. Identification and characterization of SA/Scp3 subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol* 150(3): 405-416.
- Luijsterburg, M.S., Dinant, C., Lans, H., Stap, J., Wiernasz, E., Lagerwerf, S., Warmerdam, D.O., Lindh, M., Brink, M.C., Dobrucki, J.W. et al. 2009. Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol* 185(4): 577-586.
- MacCallum, D.E., Losada, A., Kobayashi, R., and Hirano, T. 2002. ISWI remodeling complexes in *Xenopus* egg extracts: identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol Biol Cell* 13(1): 25-39.
- McGuinness, B.E., Hirota, T., Kudo, N.R., Peters, J.M., Nasmyth, K. Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. 2005. *PLoS Biol* 3(3):e86.
- Maison, C. and Almouzni, G. 2004. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4): 296-304.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H., Quivy, J.P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. 2002. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30(3): 329-334.
- Mateos-Langerak, J., Brink, M.C., Luijsterburg, M.S., van der Kraan, I., van Driel, R., Verschure, P.J. 2007. Pericentromeric heterochromatin domains are maintained without accumulation of HP1. *Mol Biol Cell* 18(4):1464-1471.
- Meehan, R.R., Kao, C.F., and Pennings, S. 2003. HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J* 22(12): 3164-3174.
- Mendez, J. and Stillman, B. 2000. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 20(22): 8602-8612.
- Michaelis, C., Ciosk, R., Nasmyth, K. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91(1):35-45.
- Milutinovich, M., Unal, E., Ward, C., Skibbens, R.V., Koshland, D. 2007. A multi-step pathway for the establishment of sister chromatid cohesion. *PLoS Genet* 3(1):e12.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., Courvalin, J.C., and Buendia, B. 1999. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108(4): 220-234.
- Misulovin, Z., Schwartz, Y.B., Li, X.Y., Kahn, T.G., Gause, M., MacArthur, S., Fay, J.C., Eisen, M.B., Pirrotta, V., Biggin, M.D. et al. 2008. Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma* 117(1): 89-102.

- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., Trouche, D., Dejean, A., and Yaniv, M. 2002. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO Rep* 3(10): 975-981.
- Murray, A.W. and Szostak, J.W. 1985. Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Biol* 1: 289-315.
- Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., Remboutsika, E., Chambon, P., and Losson, R. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* 7(4): 729-739.
- Nieto, M., Samper, E., Fraga, M.F., Gonzalez de Buitrago, G., Esteller, M., and Serrano, M. 2004. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* 23(3): 735-743.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I., and Watanabe, Y. 2002. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* 4(1): 89-93.
- Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y., and Yanagida, M. 2004. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol* 6(11): 1135-1141.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. 2001. Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 153(6): 1209-1226.
- Onn, I., Heidinger-Pauli, J.M., Guacci, V., Unal, E., and Koshland, D.E. 2008. Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24: 105-129.
- Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC. 2004. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303(5658):669-72.
- Panizza, S., Tanaka, T., Hochwagen, A., Eisenhaber, F., and Nasmyth, K. 2000. Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol* 10(24): 1557-1564.
- Passarge, E. 1979. Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am J Hum Genet* 31(2): 106-115.
- Peng, J.C. and Karpen, G.H. 2007. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol* 9(1): 25-35.
- Perez de Castro, I., de Carcer, G., and Malumbres, M. 2007. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* 28(5): 899-912.
- Peters, J.M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9(5): 931-943.
- Peters, J.M. and Bhaskara, V. 2009. Cohesin acetylation: from antiestablishment to establishment. *Mol Cell* 34(1): 1-2.
- Peters, J.M., Tedeschi, A., and Schmitz, J. 2008. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* 22(22): 3089-3114.
- Pidoux, A.L. and Allshire, R.C. 2005. The role of heterochromatin in centromere function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1455): 569-579.
- Prieto, I., Suja, J.A., Pezzi, N., Kremer, L., Martinez, A.C., Rufas, J.S., and Barbero, J.L. 2001. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* 3(8): 761-766.

- Queiroz-Machado, J., Perdigao, J., Simoes-Carvalho, P., Herrmann, S., and Sunkel, C.E. 2001. tef: a mutation that causes telomere fusion and severe genome rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 110(1): 10-23.
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. 2004. hCDC4 and genetic instability in cancer. *Cell Cycle* 3(6): 693-694.
- Rankin, S., Ayad, N.G., and Kirschner, M.W. 2005. Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Mol Cell* 18(2): 185-200.
- Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B. et al. 2006. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* 441(7089): 53-61.
- Rivera, T. and Losada, A. 2009. Shugoshin regulates cohesion by driving relocalization of PP2A in *Xenopus* extracts. *Chromosoma* 118(2): 223-233.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G., and Baylin, S.B. 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20(24): 3156-3165.
- Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouet, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R. et al. 2009. Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell* 33(6): 763-774.
- Salic, A., Waters, J.C., Mitchison, T.J. 2004. Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* 118(5):567-578.
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C. 2005. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 41(16): 2381-2402.
- Schmiedeberg, L., Weisshart, K., Diekmann, S., Meyer Zu Hoerste, G., and Hemmerich, P. 2004. High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell* 15(6): 2819-2833.
- Schoeftner, S. and Blasco, M.A. 2009. A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J* 28(16): 2323-2336.
- Shamu, C.E. and Murray, A.W. 1992. Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol* 117(5): 921-934.
- Shareef, M.M., King, C., Damaj, M., Badagu, R., Huang, D.W., Kellum, R. 2001. *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol Biol Cell* 12(6):1671-1685.
- Shintomi, K. and Hirano, T. 2009. Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev* 23(18): 2224-2236.
- Singh, P.B. and Georgatos, S.D. 2002. HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* 140(1-3): 10-16.
- Skibbens, R.V., Corson, L.B., Koshland, D., and Hieter, P. 1999. Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev* 13(3): 307-319.
- Spence, J.M., Phua, H.H., Mills, W., Carpenter, A.J., Porter, A.C., and Farr, C.J. 2007. Depletion of topoisomerase IIalpha leads to shortening of the metaphase interkinetochore distance and abnormal persistence of PICH-coated anaphase threads. *J Cell Sci* 120(Pt 22): 3952-3964.

- Strom, L., Karlsson, C., Lindroos, H.B., Wedahl, S., Katou, Y., Shirahige, K., and Sjogren, C. 2007. Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* 317(5835): 242-245.
- Strom, L. and Sjogren, C. 2007. Chromosome segregation and double-strand break repair - a complex connection. *Curr Opin Cell Biol* 19(3): 344-349.
- Sugimoto, K., Yamada, T., Muro, Y., and Himeno, M. 1996. Human homolog of *Drosophila* heterochromatin-associated protein 1 (HP1) is a DNA-binding protein which possesses a DNA-binding motif with weak similarity to that of human centromere protein C (CENP-C). *J Biochem* 120(1): 153-159.
- Sullivan, B.A., Blower, M.D., and Karpen, G.H. 2001. Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet* 2(8): 584-596.
- Sullivan, B.A. and Karpen, G.H. 2004. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 11(11): 1076-1083.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., and Peters, J.M. 2000. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* 151(4): 749-762.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A., Peters, J.M. 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 9(3):515-525.
- Sun, Y., Kucej, M., Fan, H.Y., Yu, H., Sun, Q.Y., and Zou, H. 2009. Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. *Cell* 137(1): 123-132.
- Sundin, O. and Varshavsky, A. 1980. Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* 21(1): 103-114.
- Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T., and Shirahige, K. 2009. Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol* 19(6): 492-497.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., and Almouzni, G. 2001. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3(2): 114-120.
- Taddei, A., Roche, D., Bickmore, W.A., and Almouzni, G. 2005. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 6(6): 520-524.
- Takahashi, T.S., Basu, A., Bermudez, V., Hurwitz, J., and Walter, J.C. 2008. Cdc7-Drf1 kinase links chromosome cohesion to the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 22(14): 1894-1905.
- Takahashi, T.S., Yiu, P., Chou, M.F., Gygi, S., and Walter, J.C. 2004. Recruitment of *Xenopus* Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex. *Nat Cell Biol* 6(10): 991-996.
- Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Ma, N., Kurihara, D., Ono-Maniwa, R., Nakagawa, M., Azuma, T., Uchiyama, S., and Fukui, K. 2007. PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr Biol* 17(15): 1356-1361.

- Tanaka, K., Hao, Z., Kai, M., and Okayama, H. 2001. Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *EMBO J* 20(20): 5779-5790.
- Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N.A., Mumby, M.C., and Yu, H. 2006. PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell* 10(5): 575-585.
- Terret, M.E., Sherwood, R., Rahman, S., Qin, J., and Jallepalli, P.V. 2009. Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature* 462(7270): 231-234.
- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., and Nasmyth, K. 1999. Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* 13(3): 320-333.
- Toyoda, Y. and Yanagida, M. 2006. Coordinated requirements of human topo II and cohesin for metaphase centromere alignment under Mad2-dependent spindle checkpoint surveillance. *Mol Biol Cell* 17(5): 2287-2302.
- Uhlmann, F. 2001. Secured cutting: controlling separase at the metaphase to anaphase transition. *EMBO Rep* 2(6): 487-492.
- . 2009. A matter of choice: the establishment of sister chromatid cohesion. *EMBO Rep* 10(10): 1095-1102.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400(6739): 37-42.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., and Koshland, D. 2007. DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* 317(5835): 245-248.
- Vagnarelli, P., Morrison, C., Dodson, H., Sonoda, E., Takeda, S., and Earnshaw, W.C. 2004. Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores. *EMBO Rep* 5(2): 167-171.
- Valdeolmillos, A., Rufas, J.S., Suja, J.A., Vass, S., Heck, M.M., Martinez, A.C., and Barbero, J.L. 2004. *Drosophila* cohesins DSA1 and Drad21 persist and colocalize along the centromeric heterochromatin during mitosis. *Biol Cell* 96(6): 457-462.
- Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., Ozono, K., Jabs, E.W., Inui, K., Joenje, H. 2005. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* 37(5):468-470.
- Vig, B.K. 1987. Sequence of centromere separation: a possible role for repetitive DNA. *Mutagenesis* 2(3): 155-159.
- Vos, L.J., Famulski, J.K., and Chan, G.K. 2006. How to build a centromere: from centromeric and pericentromeric chromatin to kinetochore assembly. *Biochem Cell Biol* 84(4): 619-639.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* 103(3): 399-410.
- Wang, L.H., Schwarzbraun, T., Speicher, M.R., and Nigg, E.A. 2008. Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma* 117(2): 123-135.
- Weber, S.A., Gerton, J.L., Polancic, J.E., DeRisi, J.L., Koshland, D., and Megee, P.C. 2004. The kinetochore is an enhancer of pericentric cohesin binding. *PLoS Biol* 2(9): E260.

- Weitzer, S., Lehane, C., and Uhlmann, F. 2003. A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr Biol* 13(22): 1930-1940.
- Wendt, K.S. and Peters, J.M. 2009. How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res* 17(2): 201-214.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., Yahata, K., Imamoto, F., Aburatani, H., Nakao, M., Imamoto, N., Maeshima, K., Shirahige, K., Peters, J.M. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451(7180):796-801.
- White, S.A. and Allshire, R.C. 2004. Loss of Dicer fowls up centromeres. *Nat Cell Biol* 6(8): 696-697.
- Williams, B.C., Garrett-Engle, C.M., Li, Z., Williams, E.V., Rosenman, E.D., and Goldberg, M.L. 2003. Two putative acetyltransferases, san and deco, are required for establishing sister chromatid cohesion in *Drosophila*. *Curr Biol* 13(23): 2025-2036.
- Xu, G.L., Bestor, T.H., Bourc'his, D., Hsieh, C.L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J.J., and Viegas-Pequignot, E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402(6758): 187-191.
- Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M., and Watanabe, Y. 2008. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455(7210): 251-255.
- Zeng, W., de Greef, J.C., Chen, Y.Y., Chien, R., Kong, X., Gregson, H.C., Winokur, S.T., Pyle, A., Robertson, K.D., Schmiesing, J.A., Kimonis, V.E., Balog, J., Frants, R.R., Ball, A.R. Jr, Lock, L.F., Donovan, P.J., van der Maarel, S.M., Yokomori, K. 2009. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS Genet* 5(7):e1000559.
- Zhang, J., Shi, X., Li, Y., Kim, B.J., Jia, J., Huang, Z., Yang, T., Fu, X., Jung, S.Y., Wang, Y. et al. 2008. Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol Cell* 31(1): 143-151.
- Zhang, N. and Pati, D. 2009. Handcuff for sisters: a new model for sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* 8(3): 399-402.
- Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. 2007a. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27(6): 2343-2358.
- Zhang, R., Liu, S.T., Chen, W., Bonner, M., Pehrson, J., Yen, T.J., and Adams, P.D. 2007b. HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. *Mol Cell Biol* 27(3): 949-962.

ANEXO

Serrano Á, Rodríguez-Corsino M, Losada A (2009) Heterochromatin Protein 1 (HP1) Proteins Do Not Drive Pericentromeric Cohesin Enrichment in Human Cells. PLoS ONE 4(4): e5118. doi:10.1371/journal.pone.0005118